



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	自己免疫性糸球体腎炎モデルマウスの解析 : MRL/MpJマウス由来の第1染色体テロメア領域に原因遺伝子を求めて
Author(s)	市居, 修
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第9038号
Issue Date	2009-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k9038
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39060
Type	doctoral thesis
File Information	ichii.pdf



自己免疫性糸球体腎炎モデルマウスの解析

- MRL/MpJ マウス由来の第 1 染色体テロメア領域に原因遺伝子を求めて -

北海道大学大学院獣医学研究科
比較形態機能学講座 解剖学教室
市居 修

目 次

略語表	1
総緒	5

第1章: 自己免疫性糸球体腎炎モデルマウスの作出

1) 緒言	9
2) 材料および方法	11
3) 成績	16
4) 考察	20
5) 小括	25
6) 図および表	26

第2章: 自己免疫性糸球体腎炎原因因子の検索

1) 緒言	38
2) 材料および方法	42
3) 成績	47
4) 考察	52
5) 小括	57
6) 図および表	59

第3章: 自己免疫性糸球体腎炎の性差の解析

1) 緒言	73
2) 材料および方法	76
3) 成績	79
4) 考察	82
5) 小括	87
6) 図および表	88

第4章: 自己免疫性糸球体腎炎憎悪因子の同定

1) 緒言	101
2) 材料および方法	104
3) 成績	110
4) 考察	113
5) 小括	118
6) 図および表	119

総括	133
----	-----

謝辞	136
----	-----

参考文献	137
------	-----

英文抄録	158
------	-----

略語表

1. ABC: Avidin-biotin complex アビジン-ビオチン-コンプレックス
2. *Actb*: actin beta マウス遺伝子名
3. *Apcs*: serum amyloid P-component マウス遺伝子名
4. BCL2: B-cell leukemia/lymphoma 2
5. BSA: Bovine serum albumin ウシ血清アルブミン
6. BUN: Blood urea nitrogen 血中尿素窒素
7. *Bxs1*: systematic lupus erythematosus susceptibility 7 マウス遺伝子座名
8. *Bxs3*: Y-linked autoimmune acceleration 4 マウス遺伝子座名
9. C57BL/6: C57BL/6Cr Slc マウス系統名
10. *Ccl*: chemokine (C-C motif) ligand マウス遺伝子名
11. *Ccr*: Chemokine (C-C motif) receptor マウス遺伝子名
12. *Crp*: C-reactive protein pentraxin-related マウス遺伝子名
13. CRP: C-reactive protein C-反応性蛋白
14. *Cxcl*: Chemokine (C-X-C motif) ligand マウス遺伝子名
15. *Cxcr*: chemokine (C-X-C motif) receptor マウス遺伝子名
16. DIG: Digoxigenin ジゴキシゲニン
17. dsDNA: double-stranded DNA 二本鎖 DNA
18. EGF: Epithelial growth factor 上皮成長因子
19. EIA: Enzyme immunoassay
20. ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
21. *Exo1*: Exonuclease1 マウス遺伝子名

- 22. *FasL*: Fas ligand マウス遺伝子名
- 23. *FASLG*: Fas ligand ヒト遺伝子名
- 24. *FCGR*: Fc fragment of IgG, low affinity, receptor ヒト遺伝子名
- 25. *Fcgr*: Fc receptor IgG low affinity マウス遺伝子名
- 26. Fc γ R: Fc γ 受容体
- 27. FITC: Fluorescein isothiocyanate
- 28. *Hsp*: Heat shock protein マウス遺伝子名
- 29. ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1 細胞接着分子 1
- 30. *Ifi*: Interferon activated gene マウス遺伝子名
- 31. *IFI16*: Interferon gamma-inducible protein 16 ヒト遺伝子名
- 32. IFN: Interferon インターフェロン
- 33. IGF: Insulin-like growth factor インスリン様成長因子
- 34. *Il1f6*: Interleukin 1 family member 6 マウス遺伝子名
- 35. IL: Interleukin インターロイキン
- 36. ISN/RPS: International Society of Nephrology/Renal Pathology Society
- 37. ITAM: Immune receptor tyrosine-based activation motif
- 38. ITIM: Immune receptor tyrosine-based inhibition motif
- 39. *Lbw1*: lupus NZB x NZW 1 マウス遺伝子座名
- 40. LMD: Laser Micro Dissection レーザーマイクロダイセクション
- 41. *Lprm1*: Lymphoproliferation modifier 1 マウス遺伝子座名
- 42. LPS: Lipopolysaccharide リポ多糖
- 43. *Mag*: MRL autoimmune glomerulonephritis マウス遺伝子座名
- 44. MCP-1: Monocyte chemoattractant protein 1 単球走化性因子 1

- 45. MGD: Mouse Genome Database
- 46. MHCII: Major histocompatibility complex II 主要組織適合抗原複合体クラス II 分子
- 47. MMP: Matrix metalloproteinase マトリックスメタロプロテイナーゼ
- 48. MRL/MpJ: MRL/MpJ Jms Slc^{+/+} マウス系統名
- 49. MRL-*lpr*: MRL-Fas^{lpr} マウス系統名
- 50. *Nba1*: New Zealand Black autoimmunity 1 マウス遺伝子座名
- 51. NOS: Nitric Oxide Synthase 一酸化窒素合成酵素
- 52. NZB/WF1: (NZB X NZW) F1 マウス系統名
- 53. p202: Ifi202 蛋白
- 54. *Paam*: Progression of autoimmune arthritis in MRL mice マウス遺伝子座名
- 55. PAM: Periodic acid Methenamine Silver 過ヨウ素酸メセナミン銀
- 56. PAS: Periodic acid Schiff 過ヨウ素酸シッフ
- 57. PCR: Polymerase chain reaction
- 58. QTL: Quantitative trait locus 量的形質座位
- 59. RANTES: Regulated upon activation normal T expressed and presumably secreted
- 60. RT: Reverse transcription
- 61. SAB: Streptavidin-Biotin ストレプトアビジン-ビオチン
- 62. SAP: Serum Amyloid P 血清アミロイド P
- 63. *Sbw1*: splenomegaly-NZB x NZW 1 マウス遺伝子座名
- 64. SDS: Sodium dodecyl sulfate ドデシル硫酸ナトリウム
- 65. SDS-PAGE: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
- 66. *Se1*: Selectin マウス遺伝子名

- 67. SHP-1: Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6
- 68. SLE: Systemic lupus erythematosus 全身性エリテマトーデス
- 69. *Sle1*: systemic lupus erythematosus susceptibility 1 マウス遺伝子座名
- 70. TGF- β : Transforming growth factor beta 形質転換増殖因子 β
- 71. *Tlr7*: Toll-like receptor 7 マウス遺伝子名
- 72. TNF- β : Tumor necrosis factor beta 腫瘍壊死因子 β
- 73. TRITC: Tetramethylrhodamine isothiocyanate
- 74. *Yaa*: Y chromosome autoimmune acceleration マウス遺伝子座名

総 緒

自己免疫疾患とは、自身の組織が自己に対する体液性あるいは細胞性免疫反応により破壊的な影響を受ける疾患で、関節リウマチ、自己免疫性溶血性貧血、糖尿病および全身性エリテマトーデス（SLE）を代表とする。これまで自己免疫性疾患モデルマウスとして（NZB X NZW）F1、BXSB および MRL 系統などが、皮膚病変、リンパ節腫脹、脾腫および糸球体腎炎など、自己免疫機構の破綻に起因する病態の解明に用いられてきた。これらの病態形成に関連する因子は複数存在し、各因子と各病態が複雑に関与しているため、病態別の原因因子特定は非常に困難である。たとえば、数種の疾患モデルマウスを用いて SLE の感受性および抵抗性因子を検索した研究によると、SLE の病態は短命、自己抗体の上昇、免疫複合体の出現、糸球体腎炎発症、リンパ節腫脹、脾腫および血管炎に分けられ、その原因因子は第 8 および性染色体を除く全ての染色体上に散在し、*Bxs1-6*、*Sle1-6*、*Lbw1-7*、*Sbw1-2*、*Nba1-3* あるいは *Lprm1-5* などの複数の遺伝子座に局在することが報告されている（Santiago-Raber et al., 2004）。また、上述のモデルマウスは自己免疫疾患の病態解析に非常に有用であるが、膨大な数の疾患関連因子を保有しているため、各々の原因因子の解析を困難なものとしている。すなわち、原因因子を個別に検証していくためにはノックアウトマウス、トランスジェニックマウスあるいはコンジェニックマウスを用いた解析が必須である。

上述の如く、自己免疫性糸球体腎炎は自己免疫疾患の一例で、主として全身を循環する免疫複合体が腎臓の糸球体に沈着することで発症し、患者の予後を左右する重要な病態である。糸球体腎炎の臨床症状は浮腫、血尿、蛋白尿あるいは高血圧など様々であるが、腎臓は中枢神経系などと同様に非再生性の臓器であるため、早期診断および治療が不可欠である。特に SLE は糸球体腎炎（ループス腎炎）を併発する代表的な自己免疫疾

患であり、現在、国内には 3 万人を超す患者が存在する (Japan Intractable Disease Information Center、<http://www.nanbyou.or.jp/top.html>)。

近年、SNP を用いて比較した genome wide linkage scanning 法によってヒトの第 1 染色体長腕テロメア領域の多型と SLE 発症の関連性が明らかにされている (Cantor et al., 2004; Chen et al., 2006; Wu et al., 2007)。ヒトの第 1 染色体長腕テロメア領域には、C-reactive protein pentraxin-related (*CRP*: 1q21-23)、Interferon gamma-inducible protein 16 (*IFI16*: 1q22)、Fas ligand (*FASLG*: 1q23) あるいは Fc gamma receptor family (*FCGR*: 1q23) など、主要な免疫関連遺伝子が座位している。一方、マウスの第 1 染色体テロメア領域はヒトの当領域とシンテニーがあり、上述の免疫関連遺伝子と相同の遺伝子を包含している。さらに興味深いことに、疾患モデルマウスを用いた研究において、マウスの第 1 染色体テロメア領域には、*Bxs3*、*Sle1* あるいは *Nba2* など複数の自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子座の存在が報告されている (Santiago-Raber et al., 2004)。このように、マウス第 1 染色体テロメア領域は自己免疫性糸球体腎炎発症の原因遺伝子を包含するホットスポットであるが、上記の表現型が全て同一の遺伝子に起因しているか否かは不明であり、原因遺伝子の同定には至っていない。それ故、マウスの第 1 染色体テロメア領域における自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子の同定は、本症の早期診断法および新規治療法の開発のために不可欠なステップである。

そこで本研究では、自己免疫性糸球体腎炎の原因遺伝子座が多数報告されているマウス第 1 染色体テロメア領域に着目し、本症の病態解析ならびに原因因子特定を主題とした。第 1 章では、代表的な自己免疫疾患モデルである MRL マウス由来の第 1 染色体テロメア領域と健常な C57BL/6 マウス由来の遺伝学的背景を有するコンジェニックマウスを作出し、自己免疫性糸球体腎炎モデルマウスとしての有用性を確認した。第 2 章では、

さらに狭い遺伝子導入領域を有するコンジェニックマウスを作出し、病理組織学的および分子生物学的解析を行い、自己免疫糸球体腎炎原因遺伝子について詳細な検索を行った。本モデルマウスの糸球体腎炎の病態には性差が認められたため、第3章では性腺摘出が自己免疫性糸球体腎炎の病態に与える影響について評価を行い、自己免疫性糸球体腎炎の性差について解析した。第4章では本モデルマウスを用いて、自己免疫性糸球体腎炎の病態増悪因子について網羅的解析を行い、候補因子の腎臓内発現について解析した。

第 1 章

自己免疫性糸球体腎炎モデルマウスの作出

緒 言

全身性エリテマトーデス (SLE) は代表的な全身性自己免疫疾患であり、慢性関節リウマチ様の関節炎、顔面あるいは頸部の紅斑性皮膚病変、リンパ節腫大、貧血、高ガンマグロブリン血症および二本鎖 DNA (dsDNA) に対する自己抗体陽性など種々の病態を示す。自己免疫疾患患者に出現する自己抗体は免疫複体の形成に参加し、腎臓の糸球体に沈着することでループス腎炎と呼ばれる自己免疫性糸球体腎炎を引き起こす。自己免疫性糸球体腎炎はヒトおよび疾患モデル動物において、患者の予後を左右する最も深刻な病態である (Klinman and Steinberg, 1995)。自己免疫性糸球体腎炎を自然発症するモデルマウスとして、(NZB X NZW) F1 (NZB/WF1)、BXSB あるいは MRL-Fas^{lpr} (MRL-*lpr*) 系統などが知られており、本症の病態を解析するために広く用いられてきた (Santiago-Raber et al., 2004; Henry and Mohan, 2005)。これらのモデルマウスは抗 dsDNA 抗体を代表とする血中自己抗体濃度の上昇および致死的な免疫複体性糸球体腎炎を発症する (Santiago-Raber et al., 2004)。一方、実験的な糸球体腎炎モデルとしては馬杉腎炎や Heymann 腎炎モデルなどが知られており、主としてラットに腎臓の構成成分を抗原として接種することで、抗糸球体基底膜抗体の産生および半月形成を伴う壊死性糸球体病変などヒトの Goodpasture 症候群様の症状を示すことが報告されている (Reynolds et al., 2006)。

MRL/MpJ マウスは、LG/J マウス (75.0%)、AKR/J マウス (12.6%)、C3H/HeDi マウス (12.1%) および C57BL/6J マウス (0.3%) の遺伝学的背景を有し、高い創傷治癒能力あるいは減数分裂中期特異的精巣内アポトーシスの出現などユニークな表現型を有している (Kon et al., 1999; Kon and Endoh, 2000; Leferovich et al., 2001; Masinde et al., 2001)。加えて、MRL-*lpr* マウスは Fas 抗原遺伝子の発現を欠き、皮膚病変、リン

関節腫脹、脾腫、関節炎、血管炎および重度の自己免疫性糸球体腎炎などヒトの SLE と類似した病態を示す (Andrews et al., 1978; Watanabe-Fukunaga et al., 1992)。しかしながら、興味深いことにこのような症状および重篤度は *lpr* アレルではなく、MRL マウスの遺伝学的背景に密接に関連している。すなわち、MRL-*lpr* マウスは約 5 ヶ月齢で重篤な糸球体腎炎を発症するが (Cohen and Eisenberg, 1991)、C57BL/6 マウスあるいは C3H/HeJ マウスの遺伝学的背景を持つ *lpr* のホモ接合体では 14 あるいは 16 ヶ月齢でも腎臓病理学的変化は軽度である (Kelley and Roths, 1985)。

近年、トランスジェニックマウスおよびコンジェニックマウスは自己免疫性糸球体腎炎の病態生理を解析するために幅広く用いられている。現在、研究者の関心は疾患モデルマウスの腎病理組織学的特徴および免疫機構の破綻を解析していくことで、自己免疫性糸球体腎炎感受性遺伝子座に存在する原因遺伝子を同定していくことに重きが置かれている (Henry and Mohan, 2005)。他の疾患モデルマウスを用いた研究において、マウスの第 1 染色体テロメア領域は *Bxs3* (71-99 cM)、*Sle1* (88 cM) および *Nba2* (92-94 cM) など、多数の自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子座を包含していることが報告されている (Santiago-Raber et al., 2004)。このように、自己免疫性糸球体腎炎の原因遺伝子を明らかにしていくための鍵は遺伝学的背景、とくに疾患モデルマウスの第 1 染色体テロメア領域に存在する。そこで本章では、MRL/MpJ マウス由来の第 1 染色体テロメア領域および C57BL/6 マウス由来の遺伝学的背景を有するコンジェニックマウス B6.MRLc1 (82-100) を作出し、病理組織学的解析を試みた。

材料および方法

本実験は、北海道大学の動物実験指針に従い、総長の承認を得て行われた（承認番号：8019）。

1. B6.MRLcl(82-100)コンジェニックマウスの作出

近交系である C57BL/6Cr Slc (C57BL/6) マウスおよび MRL/MpJ Jms Slc^{+/+} (MRL/MpJ) マウスは日本 SLC 社より購入し、動物は室温 22 ± 4℃、湿度 55 ± 20%、明暗周期 12 時間（午前 7 時点灯、午後 7 時消灯）の環境で、市販試料と水道水を自由摂取させた。雌の C57BL/6 マウスを雄の MRL/MpJ マウスと交配させて F1 世代を得て、雌の F1 マウスを雄の C57BL/6 と戻し交配し、N2 世代を作出した。N2 マウスの遺伝学的背景について、第 1 染色体のマイクロサテライトマーカー *D1Mit64*、*D1Mit123*、*D1Mit191*、*D1Mit200*、*D1Mit202*、*D1Mit107*、*D1Mit143*、*D1Mit15*、*D1Mit113*、*D1Mit403* および *D1Mit361* を用いてジェノタイピングを行った。他の疾患モデルマウスの報告を参考にし (Santiago-Raber, 2004)、マウスの糸球体腎炎原因遺伝子座に存在する *D1Mit202*、*D1Mit107*、*D1Mit143*、*D1Mit15*、*D1Mit113* および *D1Mit403* (81.6-100 cM) を糸球体腎炎マーカーと定義した。マイクロサテライトマーカーの染色体上の位置は Mouse Genome Database (MGD、The Jackson Laboratory, <http://www.informatics.jax.org/>) を参考にした。N3 世代作出のために同様の戻し交配を繰り返し、さらに糸球体腎炎マーカーがヘテロ接合体の N16 マウス同士を交配させ、最終的に当該領域が MRL/MpJ 型ホモ接合体となる個体を選抜した。本実験には、さらに 5 から 10 世代のホモ接合体同士の交配によって得られたマウスを用いた。なお、一連の交配作業は、第 2 染色体から 19 染色体および X 染色体のマイクロサテライトマーカーを用いたジェノタイピングと平行

して進められた。

2. マイクロサテライトマーカに対する polymerase chain reaction (PCR)

ゲノム DNA は近交系およびコンジェニックマウスの尾から採取した。すなわち、尾約 2 mm を Lysis バッファー (50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、20 mM EDTA、1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、100 mg/ml プロテイナーゼ K) 中で、56 °C で一昼夜インキュベートし、フェノール抽出を行った。後にゲノム DNA をエタノール沈殿し、500 µl の TE (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) に溶解した。前述のマイクロサテライトマーカを C57BL/6 マウスと MRL/MpJ マウスの間の多型を検出するために使用した。PCR プロトコールは iCycler (Bio-Rad Laboratories 社) を用いて、初期変性 94 °C 5 分の後、熱変性 94 °C 40 秒、アニーリング 58 °C 30 秒、伸長反応 72 °C 30 秒の 3 ステップで 35 サイクルの反応を行った。PCR 反応液および酵素はバイオライン社より購入した。増幅後のサンプルは 2 - 6% の Nusieve 3 : 1 アガロースゲル (FMC 社) を用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線ランプの下で写真撮影を行った。

3. 腎臓および脾臓における病理組織学的解析

マウスは頸椎脱臼あるいはペントバルビタール (40mg/kg) の深麻酔下で総頸動脈を切断することで放血安楽死させ、諸臓器を採取した。腎臓を 10% 中性緩衝ホルマリン液によって 72 時間以上室温で浸漬固定した。パラフィン切片 (2 µm 厚) を作製後、Periodic acid Schiff (PAS) 染色および Periodic acid Methenamine Silver (PAM) 染色を施した。糸球体病変を定量化するために、International Society of Nephrology / Renal Pathology Society (ISN / RPS) によるループス腎炎分類 (Weening et al., 2004) の病理組織学的所見を参考にし、PAS 染色標本を用いて以下のような基準を作成した。

グレード 0: 糸球体に病変が認められない、グレード 1: 糸球体に少量の PAS 陽性沈着物、軽度の増殖性病変、軽度の糸球体基底膜の肥厚、あるいは糸球体上皮細胞と糸球体包外壁との癒着が認められる、グレード 2: 糸球体の増殖性病変および膜性病変に加えて、糸球体に分節性あるいは全節性に PAS 陽性沈着物、あるいは糸球体の腫大が認められる、グレード 3: PAS 陽性沈着物が糸球体の 50%以上の領域を占める、あるいは重度の糸球体上皮細胞と糸球体包外壁との癒着が認められる、グレード 4: ボウマン嚢腔および毛細血管腔の消失、全節性に PAS 陽性沈着物、あるいは糸球体周囲に炎症細胞の浸潤および線維化が認められる。1 個体につき 100 個の糸球体の傷害を上記の基準に従ってグレード分けし、糸球体傷害の程度をスコア化した。すなわち、グレード 0 が a 個、グレード 1 が b 個、グレード 2 が c 個、グレード 3 が d 個およびグレード 4 が e 個の場合、 $(0 \times a) + (1 \times b) + (2 \times c) + (3 \times d) + (4 \times e)$ を算出し、糸球体傷害値とした。PAM 染色標本は膜性病変を詳細に観察するために用いた。

電子顕微鏡観察のため、雌の MRL/MpJ マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスの腎臓を 2.5% グルタルアルデヒドおよび 2% パラホルムアルデヒドの混合液で前固定後、0.1 M カコジル酸緩衝液で洗浄し、1% 四酸化オスミウムで後固定した。試料を上昇エタノール系列で脱水後、エポキシ樹脂に包埋し、2 日以上重合した。ブロックより超薄切片 (40 nm 厚) を作成し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色後、透過型電子顕微鏡 (JEM-100SX、JEOL 社) で観察した。

糸球体の免疫複合体、脾臓の CD3 (T 細胞マーカー) および B220 (B 細胞マーカー) 陽性細胞の検出に、ストレプトアビジン-ビオチン (SAB) 法を用いた。免疫組織化学には、100 倍希釈したビオチン化ヤギ抗マウス IgG1、IgG2a および IgG2b 抗体 (Caltag Laboratories 社)、200 倍希釈した未標識ウサギ抗マウス CD3 抗体 (DAKO 社) および 1600 倍希釈した未標識ラット抗マウス B220 抗体 (Cedarlane Laboratories 社) を一次

抗体として用いた。一次抗体のインキュベーションを 4℃で一昼夜行い、PBS で洗浄後、CD3 および B220 については未希釈のビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（ニチレイ社）および 100 倍希釈のビオチン化ヤギ抗ラット IgG 抗体（Cedarlane Laboratories 社）をそれぞれ用いた。SAB（ニチレイ社）とのインキュベーション後、免疫組織化学的反応の検出は 3-3'-diaminobenzidine-0.003% (V/V) H₂O₂ 溶液を用いて行った。反応は蒸留水で停止後、Mayer のヘマトキシリンで核染色を行った。また、抗原賦活化は脱パラフィン後に行った。すなわち、IgG1、IgG2a および IgG2b については 10 mM のクエン酸緩衝液（pH 6.0）で、CD3 および B220 については 0.4% ペプシン/0.2 M 塩酸溶液で行った。

組織計測を行って IgG 陽性糸球体率を算出した。すなわち、免疫染色標本上の IgG 陽性糸球体数を（A）、免疫染色に隣接する PAS 染色標本上の糸球体数を（B）として計測し、 $A \times 100 / B$ を IgG 陽性糸球体率として算出した。

4. 血清および尿の生化学的解析

血中のグルコース濃度をメディセーフミニ（テルモ社）を用いて計測した。血清中の尿素窒素（BUN）およびクレアチニン濃度を BUN-テストワコーおよびクレアチニン-テストワコー（和光純薬工業）を用いて計測した。血清中抗 dsDNA 抗体濃度の測定は、市販の Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）キットを用いた（ALPHA DIAGNOSTIC INTERNATIONAL 社）。マウスの尿中蛋白を尿蛋白検査紙（アルブスティック：バイエルメディカル社）で検査した。尿中蛋白排出の程度を商品の説明書に従い、以下のようにスコア化した。スコア 0：尿中蛋白が検出限界以下である、スコア 1：30 mg/dl の蛋白排出が認められる、スコア 2：100 mg/dl の蛋白排出が認められる、スコア 3：300 mg/dl の蛋白排出が認められる、スコア 4：1000 mg/dl の蛋白排出が認められる。

5. 統計処理

全てのデータは各群の平均値±標準誤差 (Mean±S. E.) で表した。検定は全てノンパラメトリック法で行い、2 群間の有意差は Mann-Whitney U 検定を、多群検定の有意差は Kruskal-Wallis 検定を、多重比較検定の有意差は Kruskal-Wallis 検定の Scheffé 法を用い、いずれも 5% 以下を有意な差とした。

成 績

B6. MRLc1 (82-100) コンジェニックマウスの作出

図 1-1a は C57BL/6 マウス、MRL/MpJ マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスの第 1 染色体のジェノタイピングの結果である。B6. MRLc1 (82-100) は *D1Mit64* から *D1Mit200* の間 (5.0-73.0 cM) および *D1Mit361* (101.5 cM) の領域が C57BL/6 型のホモ接合体、*D1Mit202* から *D1Mit403* の間 (81.6-100.0 cM) が MRL/MpJ 型のホモ接合体であった。また、第 2 から 19 染色体および X 染色体についても同様にジェノタイピングを行い、これらの染色体において B6. MRLc1 (82-100) マウスは C57BL/6 型のホモ接合体であることを確認した。図 1-1b に B6. MRLc1 (82-100) マウスの第 1 染色体地図を表わし、MGD に基づいた遺伝子名およびセントロメアからの遺伝学的距離を示した。MRL/MpJ 型のコンジェニック領域は Fas ligand (*FasL*)、Selectin (*Se1*)、Fc receptor IgG low affinity (*Fcgr*)、Interferon activated gene (*Ifi*) および Exonuclease1 (*Exo1*) など複数の免疫および細胞増殖関連遺伝子を包含していた。

B6. MRLc1 (82-100) コンジェニックマウスに出現する糸球体腎炎

図 1-2 に C57BL/6 マウス、MRL/MpJ マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウス糸球体の光学顕微鏡写真を示す。B6. MRLc1 (82-100) マウスにおいて、約 6 ヶ月齢より軽度の増殖性および膜性糸球体病変が認められ (図 1-2a)、病変は月齢と共に悪化した。12 ヶ月齢の C57BL/6 マウスの糸球体において、わずかな加齢性変化が認められたが、糸球体の増殖性あるいは膜性病変はほとんど認められなかった (図 1-2b)。一方、12 ヶ月齢の B6. MRLc1 (82-100) マウスにおいて、顕著な糸球体基底膜の肥厚、メサンギウム細胞ならびに内皮細胞の増殖およびメサンギウム基質の増加が顕著に認められた (図 1-2d-h)。

とくに、これらの雌には全節性に PAS 陽性物質の沈着、毛細血管腔およびボウマン嚢腔の消失などの糸球体硬化像や（図 1-2f）、糸球体基底膜の肥厚、スパイク様構造および糸球体基底膜の二重化などの膜性病変が明瞭に認められた（図 1-2g および h）。

高月齢のマウス糸球体について電子顕微鏡観察を行った。MRL/MpJ マウスでは、糸球体上皮細胞の足突起の癒合など、糸球体の微小変化が認められる程度であった（図 1-3a）。一方、B6. MRLc1 (82-100) マウスでは、糸球体基底膜の肥厚や基底膜上皮側に免疫複合体を思わせる高電子密度の沈着物が認められた（図 1-3b）。

図 1-4 に B6. MRLc1 (82-100) の糸球体傷害値を示す。B6. MRLc1 (82-100) マウスの糸球体傷害値は加齢性に増加し、12 ヶ月齢において雌が雄よりも有意に高値を示した。12 ヶ月齢以上の C57BL/6 マウス、MRL/MpJ マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスで糸球体傷害値を比較した。B6. MRLc1 (82-100) マウスは C57BL/6 マウスおよび MRL/MpJ マウスよりも高値を示し、雌雄共に C57BL/6 マウスと B6. MRLc1 (82-100) マウスの間に有意差が認められた。

B6. MRLc1 (82-100) コンジェニックマウスの糸球体における IgG 含有免疫複合体の沈着

12 ヶ月齢以上の C57BL/6 マウス、MRL/MpJ マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスについて、糸球体への免疫複合体の沈着を組織学的に評価した。図 1-5 は IgG1、IgG2a および IgG2b に対する免疫染色像である。IgG1 および IgG2b 陽性反応は全群の糸球体に認められたが、C57BL/6 マウスにおいて IgG 陽性反応を示す糸球体は他の二群よりも稀だった。一方、IgG2a 陽性糸球体は MRL/MpJ マウスでのみ認められた。

B6. MRLc1 (82-100) マウスの IgG1 陽性糸球体率は 10 ヶ月齢から上昇する傾向を示した（図 1-6a）。IgG1 陽性糸球体率を 12 ヶ月齢以上の C57BL/6 マウス、MRL/MpJ マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスの間で比較した。雌雄共に MRL/MpJ マウスが最も高い値を

示し、雌群で MRL/MpJ マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスが C57BL/6 マウスよりも有意に高値を示した (図 1-7a)。B6. MRLc1 (82-100) マウスにおいて IgG2a 陽性糸球体は認められなかったが、MRL/MpJ マウスにおいて IgG2a 陽性糸球体率は雌が雄よりも有意に高値を示した (図 1-7b)。雌雄共に B6. MRLc1 (82-100) マウスの IgG2b 陽性糸球体率は加齢性に緩徐な増加傾向を示した (図 1-6b)。IgG2b 陽性糸球体率を 12 ヶ月齢以上の C57BL/6 マウス、MRL/MpJ マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスで比較した。統計学的有意差は認められなかったが、雌群で B6. MRLc1 (82-100) マウスが MRL/MpJ マウスおよび C57BL/6 マウスよりも高値を示す傾向にあった (図 1-7c)。

B6. MRLc1 (82-100) コンジェニックマウスの病態生理

表 1-1 に 6 ヶ月齢の C57BL/6 マウス、MRL/MpJ マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスの臨床的パラメーターを示す。雌群の B6. MRLc1 (82-100) マウスでは、ほとんどの個体に脾腫が認められ、脾臓重量/体重の計測でも、雌雄共に B6. MRLc1 (82-100) マウスは MRL/MpJ マウスよりも有意に高値を、雌群では C57BL/6 マウスよりも有意に高値を示した。

脾臓において、T 細胞マーカーとして CD3、および B 細胞マーカーとして B220 に対する免疫組織化学を行った (図 1-8)。全群において、CD3 陽性細胞は動脈周囲リンパ組織鞘に、B220 陽性細胞はリンパ濾胞に認められた (図 1-8a-f)。B6. MRLc1 (82-100) マウスにおいて、動脈周囲リンパ組織鞘およびリンパ濾胞の拡大が認められ、B6. MRLc1 (82-100) マウスの CD3 および B220 陽性領域は C57BL/6 マウスおよび MRL/MpJ マウスよりも広がった (図 1-8c および f)。

腎重量/体重は雌雄共に MRL/MpJ マウスが最も高値を示し、雄群で MRL/MpJ マウスと B6. MRLc1 (82-100) マウスとの間に有意差が認められた (表 1-1)。糖尿病性腎症の指標

として血中グルコース濃度を計測したが、系統間で有意差は認められなかった（表 1-1）。腎機能を評価するために、血清中 BUN 濃度、クレアチニン濃度および尿中の蛋白排出を計測した（表 1-1）。血清中 BUN 濃度では、雌雄共に B6. MRLc1 (82-100) マウスが最も高値を示し、雌雄共に C57BL/6 マウスとの間に、雄群では MRL/MpJ マウスとの間に有意差が認められた。血清中クレアチニン濃度では、雌群で B6. MRLc1 (82-100) マウスが MRL/MpJ マウスよりも有意に高値を示した。尿中の蛋白排出において、系統間で有意な違いは認められなかった。

B6. MRLc1 (82-100) マウスの血中グルコース濃度、血清中の BUN およびクレアチニン濃度および尿中の蛋白排出を経時的に測定した。雄群の血中グルコース濃度は 8 および 10 ヶ月齢で雌群よりも有意に高値を示したが、雌雄共に観察期間中ほぼ一定の値 (185.1 ± 6.2 mg/dl) を示し、病的意義は見出せなかった（図 1-9a）。血清中 BUN 濃度は雌群で 10 ヶ月齢より上昇する傾向にあった（図 1-9b）。血清中クレアチニン濃度および尿中蛋白排出量は観察期間中ほぼ一定の値を示した（図 1-9c および d）。

B6. MRLc1 (82-100) コンジェニックマウスにおける自己抗体の産生

6 ヶ月齢において、血清中の抗 dsDNA 抗体濃度を C57BL/6 マウス、MRL/MpJ マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスの間で比較した。雌雄共に MRL/MpJ マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスが C57BL/6 マウスよりも有意に高値を示した（表 1-1）。

B6. MRLc1 (82-100) マウスの血清中抗 dsDNA 抗体濃度を経時的に測定した。雌では 6 ヶ月齢より増加が認められたが、雄では加齢性に緩やかに上昇する傾向にあった（図 1-9e）。有意な雌雄差は 8 ヶ月および 12 ヶ月齢で認められ、いずれも雌が雄よりも高値を示した。

考 察

腎臓の光学顕微鏡観察において、B6. MRLc1 (82-100) マウスの糸球体には増殖性病変および膜性病変を主体とする重篤な糸球体傷害が認められた。さらに、組織計測によって糸球体傷害を数値化したところ、B6. MRLc1 (82-100) マウスは加齢が進んだ C57BL/6 マウスよりも重篤な糸球体傷害を示した。このことは、B6. MRLc1 (82-100) マウスの糸球体傷害は加齢性変化ではないことを示す。電子顕微鏡観察によって、B6. MRLc1 (82-100) マウスの糸球体基底膜に高電子密度の沈着物が認められた。これは免疫複合体であり、自己免疫性糸球体腎炎の病理発生に主要な役割を果たしていることが報告されている (Ferluga et al., 2000; Hvala et al., 2000)。さらに、B6. MRLc1 (82-100) マウスの糸球体に IgG 陽性免疫複合体の沈着がみられたことより、B6. MRLc1 (82-100) マウスは明らかに自己免疫性糸球体腎炎を発症することが証明された。以上の知見は、MRL/MpJ マウスが第 1 染色体に自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子座を有することを示し、著者はこの遺伝子座を MRL autoimmune glomerulonephritis (*Mag*) と命名した。

興味深いことに、関節炎、皮膚炎あるいは血管炎など、MRL 系統でみられる表現型は B6. MRLc1 (82-100) マウスでは認められなかった。上記表現型の原因遺伝子座である *Paam1* (Progression of autoimmune arthritis in MRL mice 1)、*Paam2*、*Lprm1* (Lymphoproliferation modifier 1; vasculitis susceptibility loci for MRL strain) および *Lprm2* は、それぞれ MRL マウスの第 15、第 19、第 4 および第 3 染色体上に存在する (Kamogawa et al., 2002; Santiago-Raber et al., 2004)。B6. MRLc1 (82-100) マウスは第 1 染色体テロメア領域以外の MRL/MpJ マウス由来自己免疫疾患原因遺伝子座を持たないため、これらの表現型を示さない。さらに、B6. MRLc1 (82-100) マウスの糸球体腎炎は MRL/MpJ マウスよりも病理組織学的に重篤な病態を示した。Wan らは、*Lprm3*

(Lymphoproliferation modifier 3、第 14 染色体) は MRL マウスの遺伝学背景に存在する自己免疫性糸球体腎炎抵抗性遺伝子座であることを報告している (Wang et al., 1997)。加えて Rozzo らは、マウスの遺伝学的背景が NZB マウス由来自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子座に与える影響について検討し、BALB/c マウスよりも C57BL/6 マウス由来の遺伝学的背景を持つコンジェニックマウスにおいて重篤な糸球体腎炎が認められることを報告している (Rozzo et al., 1996)。すなわち、B6.MRLc1(82-100)マウスは、MRL マウス由来の糸球体腎炎抵抗性遺伝子座を持たない点および C57BL/6 マウス由来の糸球体腎炎増悪遺伝子座を有する点で MRL マウスよりも重篤な糸球体腎炎を呈したと思われる。

B6.MRLc1(82-100)マウスでは、IgG1 および IgG2b 陽性糸球体が認められ、IgG1 陽性糸球体率は C57BL/6 マウスよりも高値だった。興味深いことに、IgG2a 陽性糸球体は MRL/MpJ マウスにのみ認められ、C57BL/6 マウスおよび B6.MRLc1(82-100)マウスでは検出されなかった。近年、多くの免疫学的研究は Th1/Th2 バランスの変化が自己免疫性糸球体腎炎の病理発生に多大な影響を与えていることを報告している。Shimizu らは、Th1 型自己免疫反応は増殖性糸球体病変 (IgG2 沈着) に、一方、Th2 型自己免疫反応は膜性糸球体病変 (IgG1 沈着) に至ることを IL-27 受容体欠損 MRL-*lpr* マウスを用いて明らかにした (Shimizu et al., 2005)。さらに、IgG2a は MRL-*lpr* の血清中に最も豊富に存在するサブタイプである (Balomenos et al., 1998)。以上より、*Mag* は Th1/Th2 バランスに影響する遺伝子を包含し、そのバランス変化が各 IgG サブタイプ免疫複合体沈着のバランス変化に関連していると考えられる。

B6.MRLc1(82-100)マウスの BUN 濃度は加齢性に増加する傾向にあったが、クレアチニンおよび尿中蛋白排出は観察期間中ほぼ一定値を示した。糸球体で過剰濾過された蛋白は近位尿細管で再吸収され、これらの蛋白は尿細管上皮細胞のアポトーシスあるいは増

殖など、細胞のターンオーバーを促進することが示唆されている (Exaire et al., 1972; Thomas et al., 1999)。すなわち、蛋白尿は糸球体傷害より尿細管間質性病変のマーカーとして重要な意義を有する (Thomas et al., 1993, 1999)。これらの報告と一致し、尿細管間質性病変より糸球体傷害を顕著に示す B6. MRLc1 (82-100) マウスにおいて、有意な蛋白尿排出の増加は認められなかったと考えられる。

糖尿病性腎症の指標として血中グルコース濃度を計測したが、B6. MRLc1 (82-100) マウスの値は観察期間中、正常値で推移した。加えて、病理組織学的検索においても、糸球体の小結節性病変や輸出細動脈の硝子化などの糖尿病性腎症病理像は認められなかった。一方、B6. MRLc1 (82-100) マウスの血清中抗 dsDNA 抗体濃度は加齢性に有意に増加したことから、明らかに自己免疫疾患を発症しているものの、血清中抗 dsDNA 抗体濃度と病態パラメーターとの間に有意な相関は見出されなかった。既報によれば、抗 dsDNA 抗体濃度の上昇だけでは自己免疫性糸球体腎炎の病理発生に不十分であることが自己免疫疾患モデルマウスを用いて報告されている (Lefkowitz and Gilkeson, 1996; Izui et al., 1984; Yoshida et al., 1981)。近年、核を構成する dsDNA、ssDNA およびヒストンに加えて、Interferon activated gene 200 (*Ifi200*) ファミリーに属する *Ifi202* 蛋白 (p202) あるいは Heat shock protein (*Hsp*) ファミリーに属する Hsp70 などの新規の因子が自己免疫疾患の病理発生に参加することが示唆されている (Hueber et al., 2004)。とくに *Ifi200* 遺伝子群は *Mag* 上に座位し、細胞の成長および分化に重要な制御因子ファミリーを構成している (Johnstone and Trapani, 1999)。さらに、p202 はアポトーシスを抑制することによって自己免疫疾患に対する感受性を増大させていることが報告されている (Xin et al., 2006)。それ故、抗核抗体としての抗 dsDNA 抗体のみならず、p202 を含む他の因子も自己免疫性糸球体腎炎の病理発生に重要な役割を果たしていると考えられる。

MRL/MpJ マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスの糸球体傷害値、IgG 陽性糸球体数および血清中抗 dsDNA 抗体濃度には著明な雌雄差が認められ、いずれも雌が雄よりも高値を示した。ヒトの SLE 発症割合は女性:男性で 9:1 である (Soto et al., 2004; Grimaldi et al., 2005)。また、NZB/WF1 および MRL-*lpr* は 5 ヶ月齢までに自己免疫疾患を発症し、血中抗核抗体濃度の上昇および糸球体腎炎を呈するが、とくに雌が雄よりも重篤な病態を示す (Bell et al., 1973; Pisetsky et al., 1980; Honda et al., 1999)。近年、性ホルモン、とくにエストロゲンが B 細胞の成熟、選抜および活性化に影響を与え、自己免疫疾患感受性マウスの病態を悪化させることが報告されている (Grimaldi et al., 2005)。また、自己免疫疾患モデルである R4A- γ 2b BALB/c マウスにエストロゲンを投与することで、B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2)、Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6 (SHP-1) および CD22 の発現が増大した (Grimaldi et al., 2002)。Bcl-2 は自己反応性 B 細胞の生存を促し、SHP-1 および CD22 は本細胞除去に必要な B 細胞受容体交差反応の閾値を上げることが報告されている (Grimaldi et al., 2002)。上記の報告より、MRL/MpJ マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスで認められた雌雄差は性ホルモンに左右されることが強く示唆された。それ故、MRL 由来自己免疫性糸球体腎炎の雌雄差を明らかにするために、性ホルモンの影響、とくにエストロゲンに調節される B 細胞性免疫寛容に焦点を当てた更なる研究が必要である。

第 1 染色体テロメア領域において、*Bxs3*、*Sle1* および *Nba2* などの自己免疫性糸球体腎炎感受性遺伝子座の存在が BXSB、NZW および NZB マウスで報告されている (Santiago-Raber et al., 2004)。近年、*Ifi202* はマイクロアレイ解析によって *Bxs3* および *Nba2* の原因遺伝子であること、さらに *Nba2* では *Ifi202* のプロモーター領域多型が自己免疫疾患の発症に関与することが示唆されている (Rozzo et al., 2001; Haywood et al., 2006)。興味深いことに、MRL マウスは *Ifi202* プロモーター領域に

NZB 系統と同様の多型を有することが知られている (Rozzo et al., 2001)。しかしながら、NZB マウスの第 1 染色体テロメア領域 (79-109 cM) および C57BL/6 マウスの遺伝学的背景を有する B6.NZB-Nba2 コンジェニックマウスは糸球体腎炎を発症せず、脾腫および血中抗核抗体濃度の上昇を示すのみである (Rozzo et al., 2001)。本研究では、MRL マウスの第 1 染色体テロメア領域 (82-100 cM) および C57BL/6 マウスの遺伝学的背景を有する B6.MRLc1 (82-100) マウスにおいて糸球体腎炎および脾腫の両方が認められた。それ故、*Ifi202* のみならず他の原因遺伝子が B6.MRLc1 (82-100) マウスを含む自己免疫疾患モデルで主要な役割を果たしている可能性も否定できない。

B6.MRLc1 (82-100) マウスにおいて CD3 陽性細胞および B220 陽性細胞領域の拡大が認められた。Fc γ 受容体は幅広い免疫担当細胞に発現するが、免疫応答活性型の *Fcgr1/3* および抑制型の *Fcgr2b* がマウス第 1 染色体上の自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子として注目されている。例えば、活性化型 *Fcgr1/3* 欠損 BXSb マウスは自己免疫性糸球体腎炎発症に抵抗性を示す (Lin et al., 2006)。加えて、抑制型 *Fcgr2b* (第 1 染色体、92.3 cM) のプロモーター領域多型が MRL を含む自己免疫疾患モデルマウス間で共通して認められ、その多型は自己反応性 B 細胞の *Fcgr2b* 発現を減少させ、自己抗体の上昇および自己免疫疾患の発症を誘導することが知られている (Jiang et al., 2000; Lin et al., 2006)。以上の知見より、MRL 型の *Fcgr2b* プロモーター領域多型が、免疫細胞の過度の活性化を引き起こすことによって、自己免疫性糸球体腎炎の病理発生に関わっている可能性も考えられた。

結論として、本章では B6.MRLc1 (82-100) コンジェニックマウスが脾腫、血清中抗 dsDNA 抗体濃度の上昇および糸球体への免疫複合体の沈着を呈することから、明らかな自己免疫性糸球体腎炎の発症を証明した。本マウスは自己免疫性糸球体腎炎モデルとして有用であり、原因因子の解明のため、詳細な検索を次章に展開する。

小 括

自己免疫性糸球体腎炎は多くの全身性自己免疫疾患に合併する。糸球体傷害の程度は患者の予後を左右する重要な指標である。これまで種々の疾患モデルマウスを用いて、第 1 染色体テロメア領域に多数の自己免疫疾患感受性遺伝子座の存在することが報告されてきた。本章では、第 1 染色体約 82-100 cM が MRL/MpJ マウス型、その他が C57BL/6 マウス型である B6.MRLc1 (82-100) コンジェニックマウスを作出し、腎病理学的特性を中心に解析した。

C57BL/6 マウスと (C57BL/6 X MRL/MpJ) F1 マウスとの戻し交配を 16 世代以上繰り返して、第 1 染色体 82-100 cM のみが MRL マウス型ホモである B6.MRLc1 (82-100) マウスを作出し、対照群 (C57BL/6 マウスおよび MRL/MpJ マウス) と比較解析した。

B6.MRLc1 (82-100) マウスにおいて 6 ヶ月齢から軽度の糸球体病変が認められた。その糸球体基底膜は肥厚し、IgG1 および IgG2b の沈着が検出された。糸球体傷害はとくに雌で重篤であり、加齢性に増悪した。脾臓の相対重量も B6.MRLc1 (82-100) マウスで有意に高く、B 細胞および T 細胞領域の拡大が認められた。B6.MRLc1 (82-100) マウスのクレアチニン、血糖値および尿中蛋白値は各月齢で正常範囲内であったが、血中 BUN および抗 dsDNA 抗体濃度は加齢性に増加し、6 ヶ月齢で有意に高値を示した。

以上より、B6.MRLc1 (82-100) マウスは明らかに自己免疫性糸球体腎炎を発症し、MRL マウス由来自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子は第 1 染色体約 82-100 cM に座位することが示された。

図および表

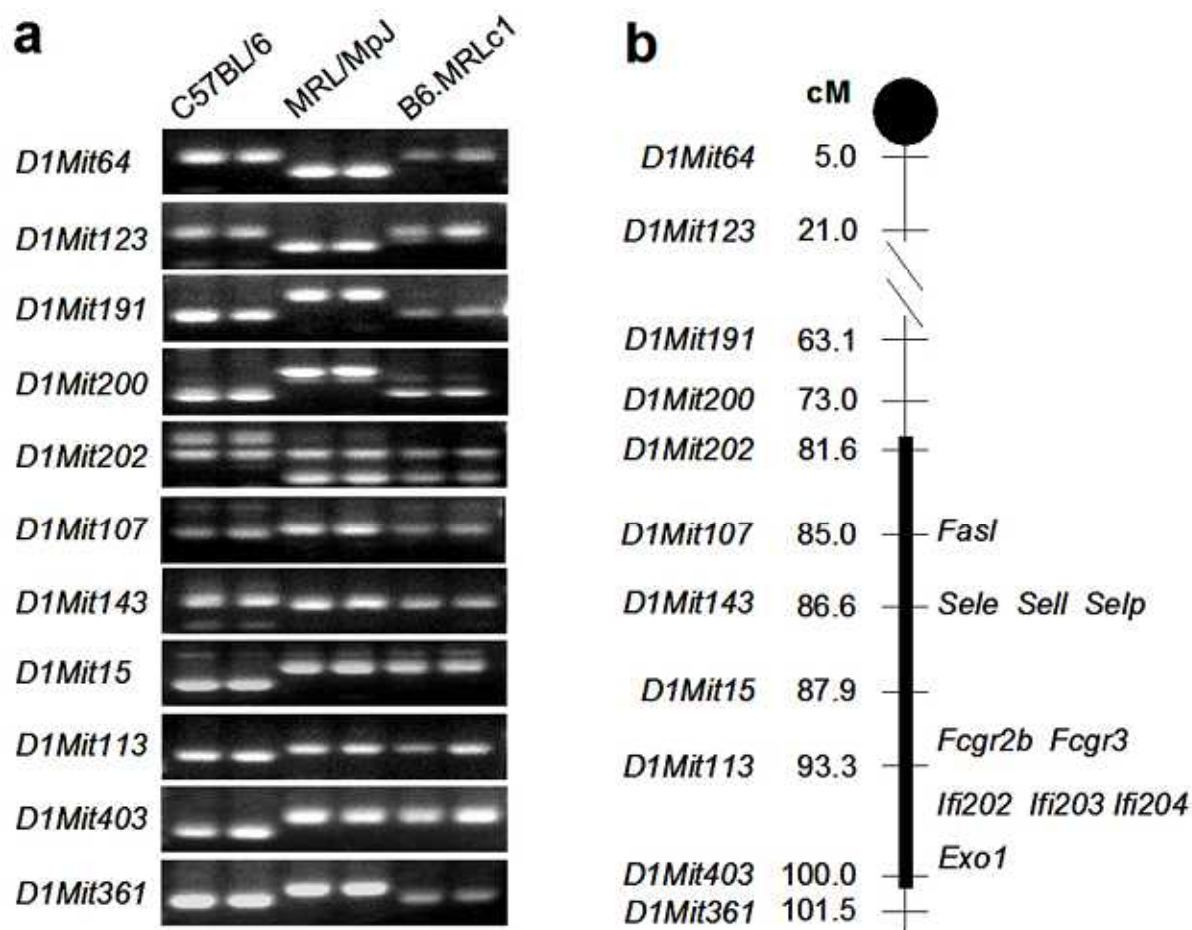


Fig. 1-1. Chromosome 1 of B6.MRLc1(82-100) congenic mouse. (a) Genotyping in genomic DNA by using microsatellite markers. (b) Schematic representation. The polymorphism between strains is detected as a size difference in the PCR products (panel a). In B6.MRLc1(82-100), *D1Mit64-200* (5.0-73.0 cM) and *D1Mit361* (101.5 cM) are C57BL/6 types, and *D1Mit202-403* (81.6-100.0 cM), defined as glomerulonephritis markers, are MRL/MpJ types. The glomerulonephritis markers used for genotyping are shown on the left-hand side (scale in cM, panel b). The MRL/MpJ type congenic interval is indicated by the bold line. Some immune- or cell proliferation-associated genes associated with congenic intervals, such as Fas ligand (*FasI*), selectin endothelial (*Sele*), selectin lymphocyte (*Sell*), selectin platelet (*Selp*), Fc receptor IgG low affinity (*Fcgr*), interferon activated gene (*Ifi*), and exonuclease1 (*Exo1*), are indicated on the right-hand side.

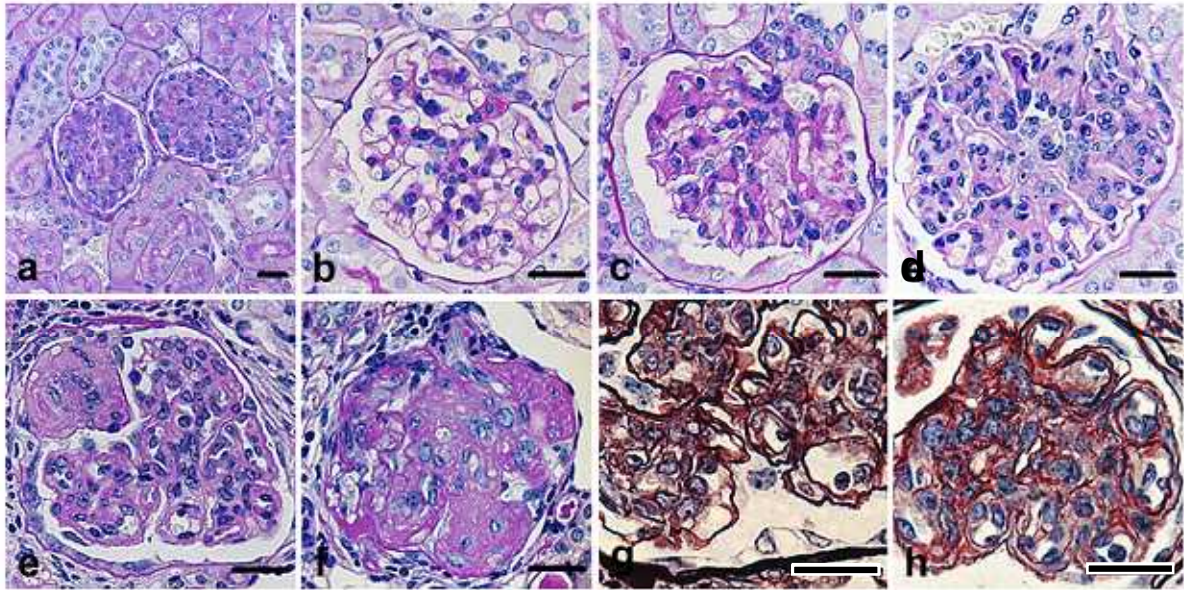


Fig. 1-2. Light micrographs of renal cortices from 6-month-old and over 12-month-old mice. (a) 6-month-old female B6.MRLc1(82-100). (b) 12-month-old male C57BL/6. (c) 17-month-old male MRL/MpJ. (d) 12-month-old male B6.MRLc1(82-100). (e-h) 12-month-old female B6.MRLc1(82-100). In B6.MRLc1(82-100), mild cell proliferation and membranous hypertrophy are clearly observed in glomeruli from a 6-month-old but no significant changes are observed in the tubulointerstitial region (panel a). In a 12-month-old C57BL/6, no remarkable membranous or proliferative lesion is found (panel b). In glomeruli of MRL/MpJ and B6.MRLc1(82-100) older than 12 months, glomerular damage with thickening of glomerular basement membrane, proliferation of endothelial and mesangial cells, and expansion of the mesangial matrix, are observed (panels c and d). In a 12-month-old female B6.MRLc1(82-100), severe glomerular damage with the disappearance of capillary and capsular lumina, global deposition of PAS-positive material, and periglomerular infiltration of inflammatory cells and fibrosis, are observed. PAS- (panels e and f) and PAM-stain (panels g and h). Scale bars, 20 μ m.

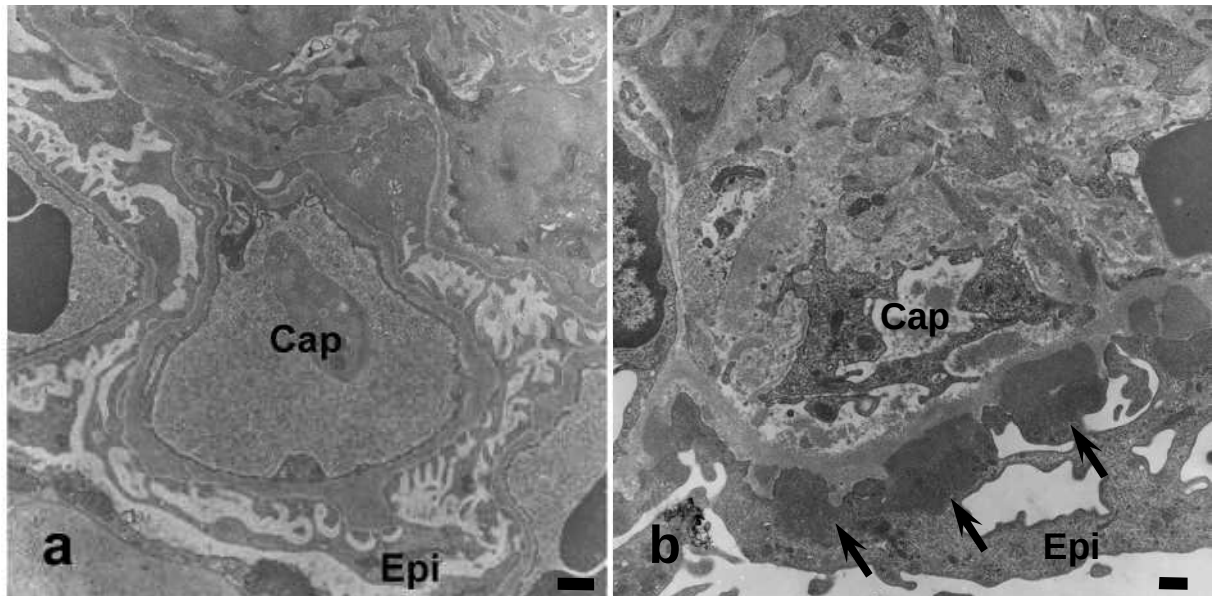


Fig. 1-3. Transmission electron micrographs of glomeruli. (a) 9-months-old MRL/MpJ. (b) 11-months-old B6.MRLc1(82-100). In MRL/MpJ, minor glomerular abnormalities such as epithelial foot-process fusion are observed (panel a). In B6.MRLc1(82-100), wrinkling of glomerular basement membrane (GBM) and electron-dense deposits (arrows) are clearly observed (panel b). Cap: capillary lumen. Epi: epithelial cell. Scale bars, 0.5 μ m.

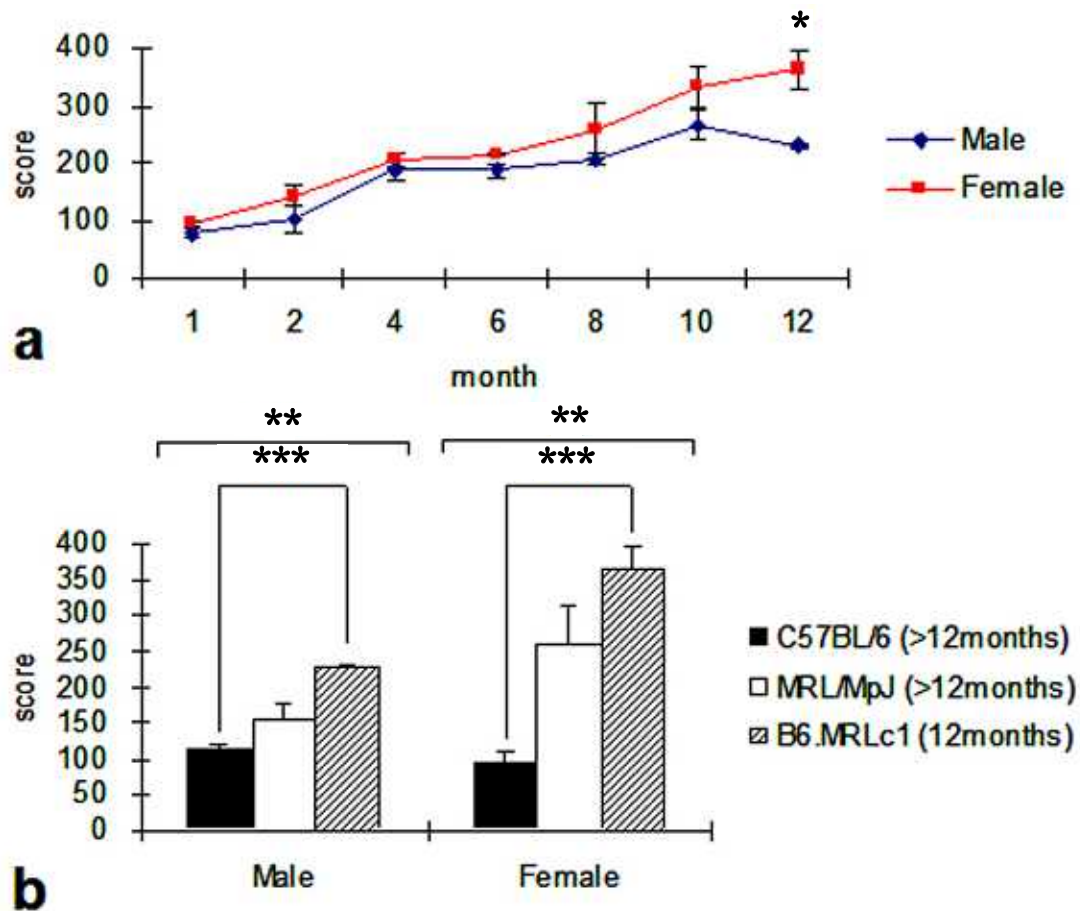


Fig. 1-4. Glomerular damage score. (a) Time course in B6.MRLc1(82-100). (b) Comparison of C57BL/6, MRL/MpJ, and B6.MRLc1(82-100) over 12 months old. Each value represents the mean $\pm$ S.E. *: Significantly different from males of the same strain (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$). **: Significant strain difference in each sex group (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). ***: Significant differences in multiple comparisons following the Kruskal-Wallis test (Scheffé method, $p < 0.05$). $n = 4$ (a) or 5 (b). B6.MRLc1: B6.MRLc1(82-100). Male (◆) and female (■).

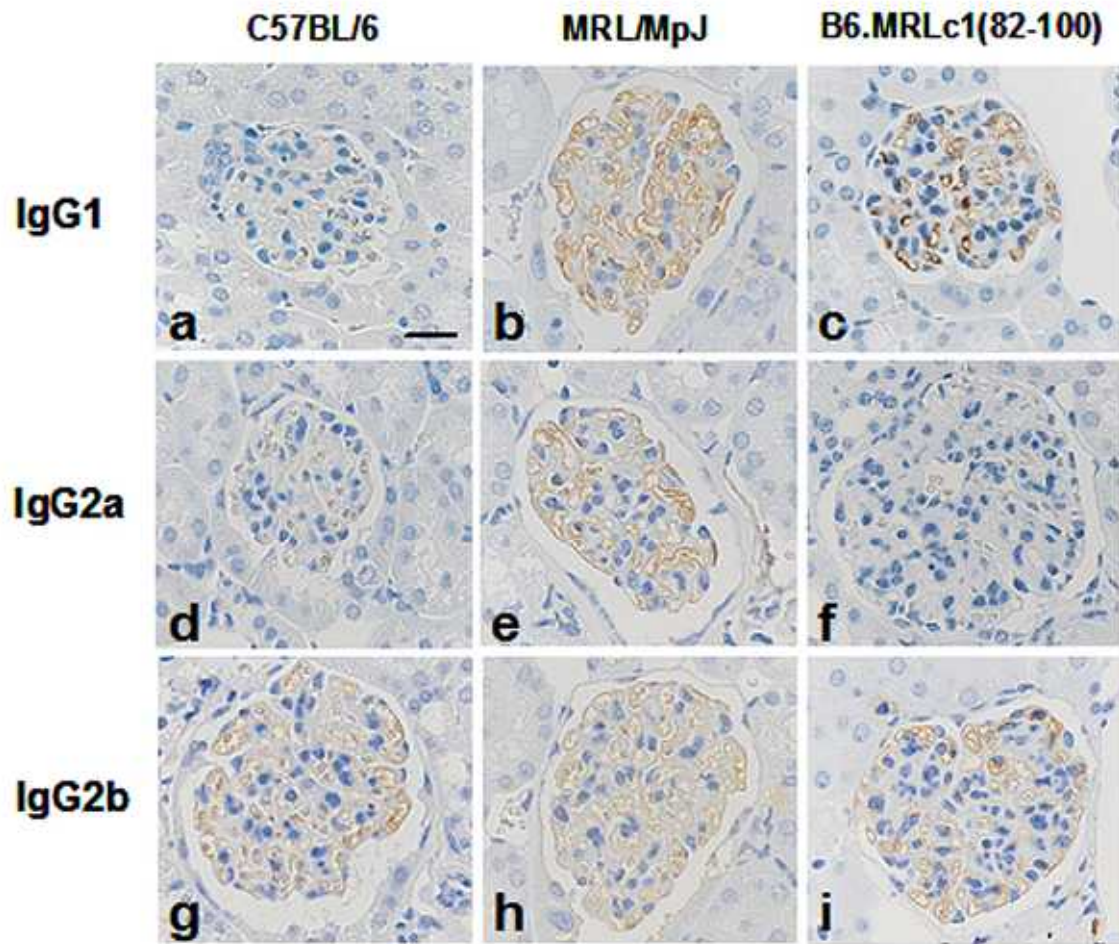


Fig. 1-5. Immunohistochemical detection of IgG subtypes in mice over 12 months old. (a-c) IgG1. (d-f) IgG2a. (g-i) IgG2b. Clear immunoreactions of IgG1 are observed in glomerular basement membranes of MRL/MpJ (panel b) and B6.MRLc1(82-100) (panel c) but these reactions are very few in C57BL/6 (panel a). Similar reactions of IgG2a are observed in the glomeruli of MRL/MpJ (panel e) but not in those of C57BL/6 (panel d) and B6.MRLc1(82-100) (panel f). IgG2b-positive reactions are observed in the glomeruli of all strains (panel g-i). Scale bar, 20 μ m.

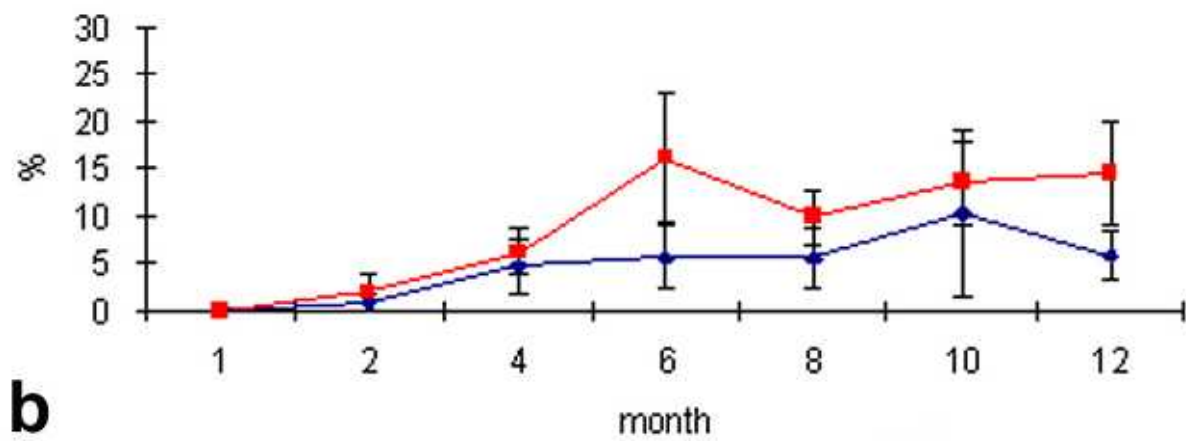
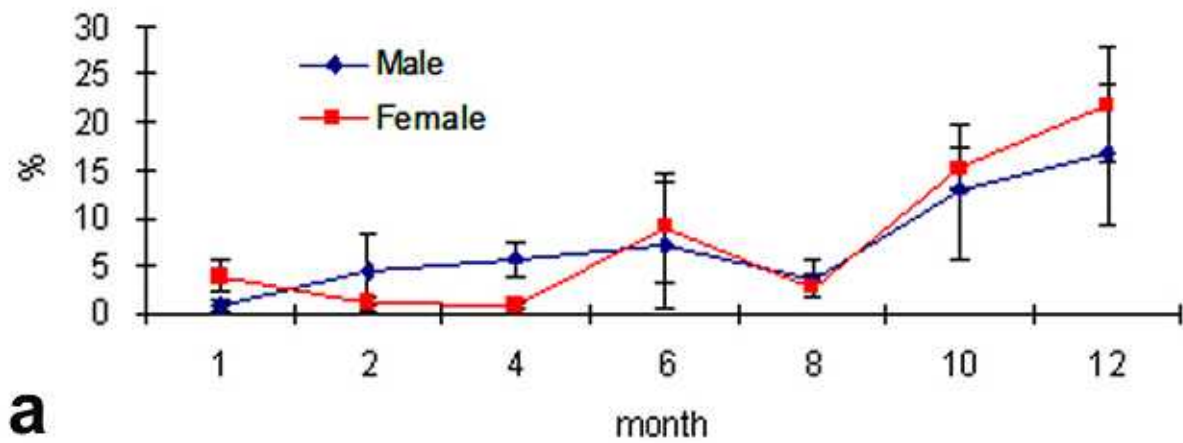


Fig. 1-6. Time course of the ratios of IgG-positive glomeruli in B6.MRLc1(82-100). (a) IgG1. (b) IgG2b. Each value represents the mean $\pm$ S.E. $n=4$. Male (◆) and female (■). Significant sex-differences are not observed in same age (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$).

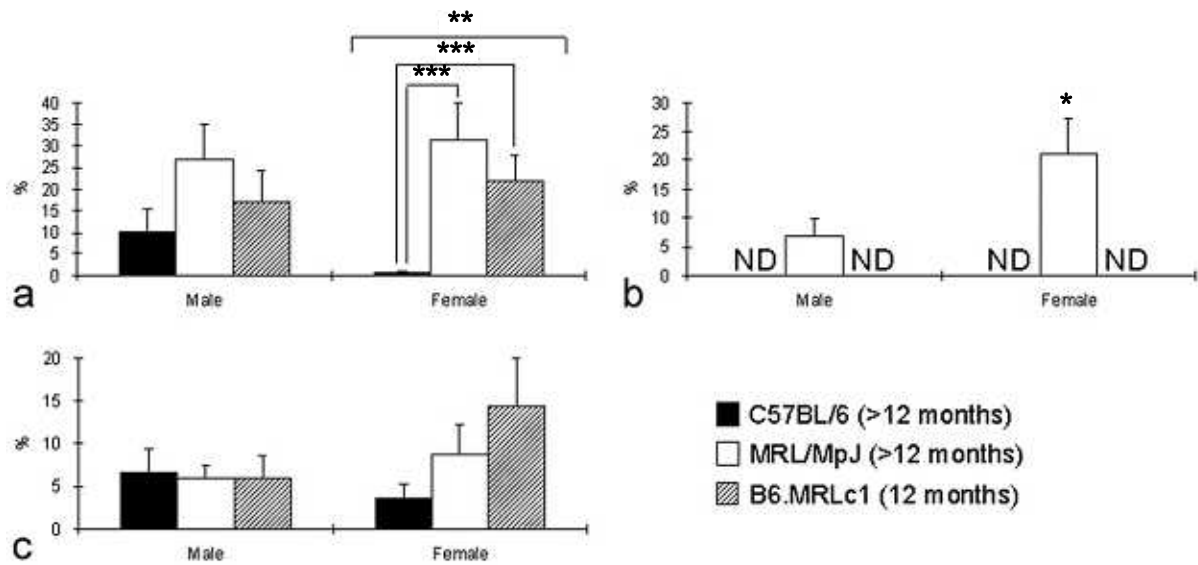


Fig. 1-7. Comparison of the ratios of IgG-positive glomeruli in over 12-month-old mice. (a) IgG1. (b) IgG2a. (c) IgG2b. Each value represents the mean $\pm$ S.E. *: Significantly different from males of the same strain (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$). **: Significant strain difference in each sex group (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). ***: Significant differences in multiple comparisons following the Kruskal-Wallis test (Scheffé method, $p < 0.05$). ND: not detected. $n = 5$. B6.MRLc1: B6.MRLc1(82-100).

Table 1-1. Summary of clinical parameters in C57BL/6, MRL/MpJ, and B6.MRLc1(82-100) at 6 months of age.

	C57BL/6		MRL/MpJ		B6.MRLc1(82-100)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Body Weight (g)	28.3	29.5	47.3 ^B	43.7 ^{B, Co}	32.0	27.4
Total kidney weight/ Body weight (%)	1.4	1.2	1.7 ^{Co}	1.4	1.2	1.1
Spleen weight/ Body weight (%)	0.3	0.4	0.2	0.3	0.5 ^M	1.0 ^{*, B, M}
Blood Glucose (mg/dl)	238.8	247.4	240.5	186.5	233.9	194.5
Blood Urea Nitrogen (mg/dl)	24.9 [*]	17.0	22.0	31.0 ^{*, B}	36.0 ^{B, M}	35.1 ^B
Creatinine (mg/dl)	0.5	0.4	0.2	0.2	0.4	0.5 ^M
Urine protein score (+)	1.5 [*]	0.7	2.1	1.3	1.6	1.3
Anti-dsDNA antibody (µg/ml)	65.0	61.9	127.1 ^B	316.9 ^B	114.9 ^B	248.2 ^B

Values: mean. n = 4. *: Sex difference (Mann-Whitney *U* test, $p < 0.05$). B: Strain difference vs. C57BL/6, M: Strain difference vs. MRL/MpJ, and Co: Strain difference vs. B6.MRLc1(82-100) (multiple comparisons following the Kruskal-Wallis test, Scheffé method, $p < 0.05$).

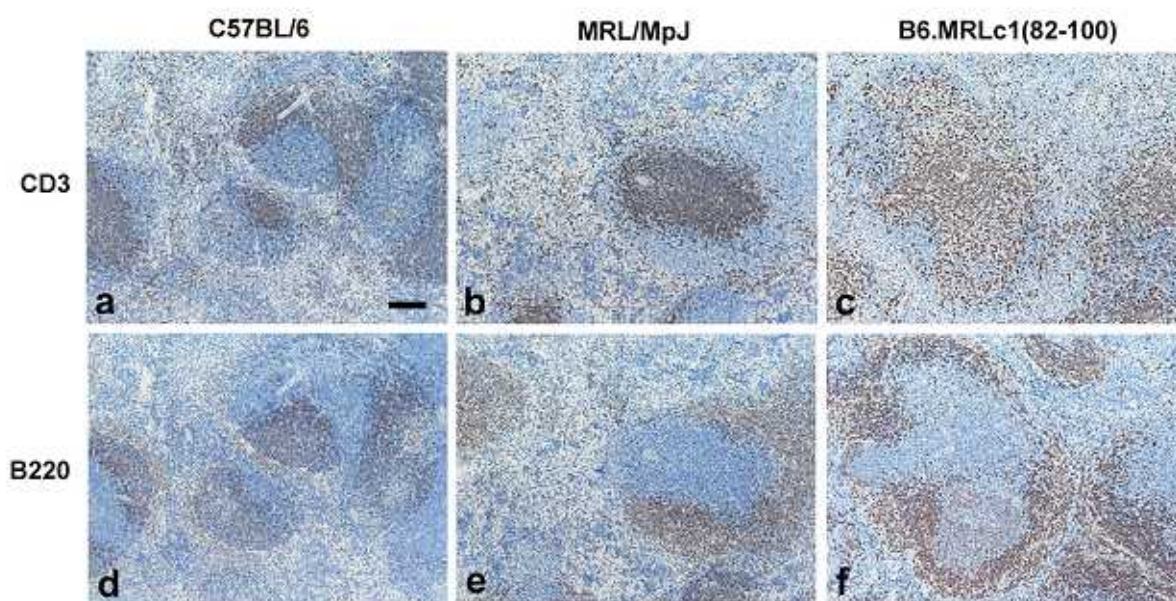


Fig. 1-8. Immunohistochemical detection of CD3- or B220-positive cells in 6-month-old mice spleen. (a-c) CD3. (d-f) B220. In all animals, CD3- and B220-positive cells are mainly observed in the periarteriolar lymphatic sheath and splenic lymph follicle, respectively. Notably, CD3- or B220-positive areas in B6.MRLc1(82-100) (panels c and f) are more widely observed than those in both C57BL/6 (panels a and d) and MRL/MpJ (panels b and e). Scale bars, 200 μ m.

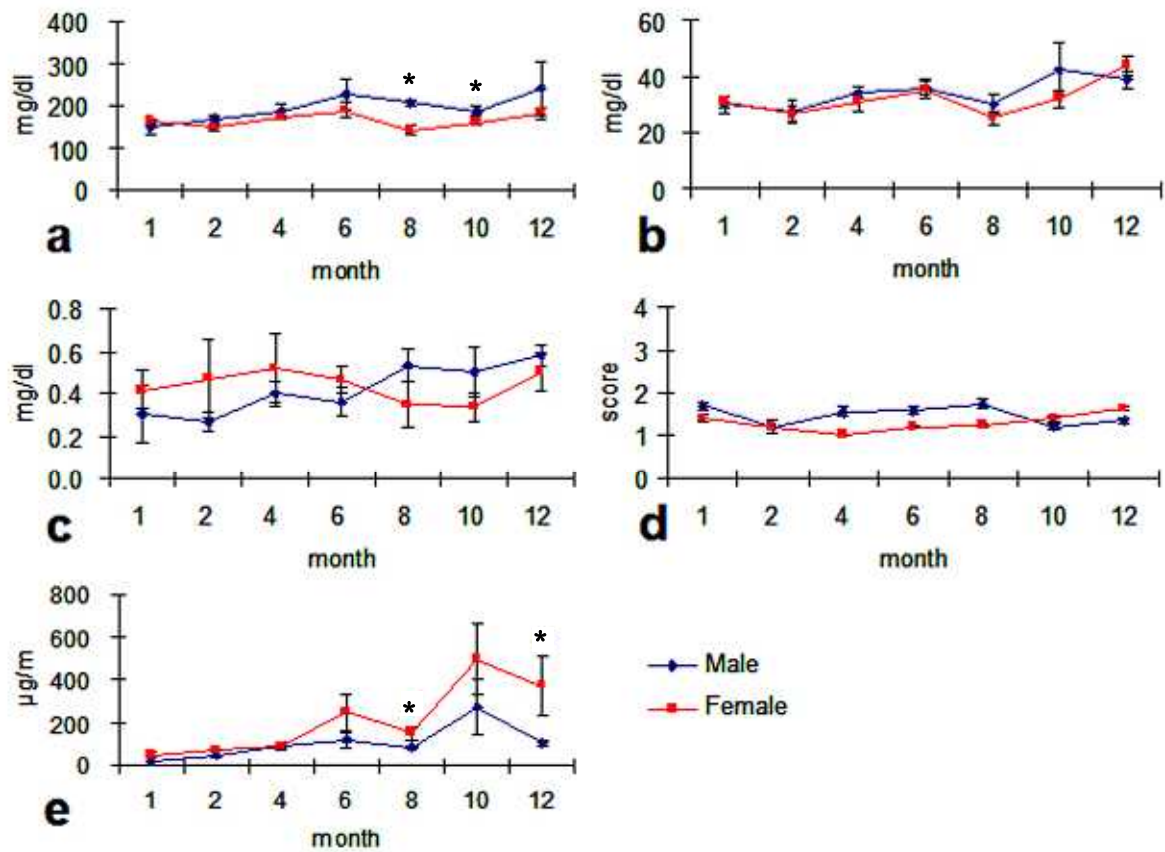


Fig. 1-9. The time courses of clinical parameters in B6.MRLc1(82-100). The serum levels of blood glucose (a), BUN (b), creatinine (c), urine protein (d), and anti-dsDNA antibody (e). Each value represents the mean $\pm$ S.E. *: Significantly different from males of the same strain (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$). $n = 4$. B6.MRLc1: B6.MRLc1(82-100). Male ($\blacklozenge$) and female ($\blacksquare$).

第 2 章

自己免疫性糸球体腎炎原因因子の検索

緒 言

自己免疫性糸球体腎炎は全身性エリテマトーデス (SLE) の最も重篤な病態の一つであり、腎炎の程度は患者の予後を左右する。多くの先行研究において、自己免疫疾患モデルマウスである BXSB、NZB および NZW 系統由来のコンジェニックマウスが作出され、自己免疫疾患の病態を解析するために用いられてきた (Santiago-Raber et al. 2004)。マウスの第 1 染色体テロメア領域には自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子座である *Bxs3* (71-99 cM)、*Slle1* (88 cM) および *Nba2* (92-94 cM) などが存在する (Santiago-Raber et al. 2004)。第 1 章において、著者は B6. MRLc1 (82-100) コンジェニックマウスを作出し、自己免疫性糸球体腎炎モデルマウスとして有用であることを示した。本マウスは第 1 染色体テロメア領域 (82-100 cM) に自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子座 (*Mag*: MRL autoimmune glomerulonephritis) を有し、脾腫、血中抗 double strand DNA (dsDNA) 抗体の上昇および免疫複合体の沈着を伴う糸球体腎炎の発症に関連している (第 1 章)。

第 1 染色体 82-100 cM は複数の免疫および細胞増殖関連遺伝子を包含しており、過去の報告において当領域と自己免疫性糸球体腎炎の関連性が示唆されている。すなわち、82-86 cM には細胞のアポトーシスを調節する Fas ligand (*FasL*, 85.0 cM) および 細胞接着を制御する Selectin ファミリー (*Se1*, 86.6 cM) が存在し、これらの機能不全は自己免疫疾患モデルにおける糸球体腎炎の発症を誘導する (Ito et al., 2003; Watanabe-Fukunaga et al., 1992; He et al., 2006)。また、94.2 cM には炎症性蛋白として知られる C-反応性蛋白 (CRP) をコードする C-reactive protein pentraxin-related (*Crp*) および 血清アミロイド P (SAP) をコードする Serum amyloid P-component (*Apcs*) が存在する。CRP および SAP はアポトーシス細胞に発現するリガンドを認識し、自己抗原

の提示および除去に重要な役割を果たしている (Mold et al., 2001)。 *Apcs* 欠損マウスは糸球体腎炎を発症することや (Bickerstaff et al., 1999)、自己免疫疾患モデルである (NZB X NZW) F1 (NZB/WF1) マウスへの CRP 投与は生存日数の増加および血中自己抗体濃度の減少を引き起こすことが報告されている (Du Clos et al., 1994)。一方、細胞の生存、増殖および分化を制御しているインターフェロン誘導性蛋白をコードする Interferon activated gene 202 (*Ifi202*: 95.2 cM) のプロモーター領域多型が NZB マウスの自己免疫疾患発症に関連することも示唆されており、MRL マウスも当該領域に同様の多型を有している (Haywood et al., 2006; Rozzo et al., 2001)。

自己免疫性糸球体腎炎の発症およびその病理組織学的特徴は、糸球体に沈着する免疫複合体に大きく左右される (Ferluga et al., 2000; Hill et al., 2005; Hvala et al., 2000)。マウスの第 1 染色体 82-100 cM は、IgG の Fc 部分に低親和性を、免疫複合体に高親和性を示す Fc γ 受容体 (Fc γ R) ファミリーの遺伝子群を包含している (Takai, 2005a; Takai, 2005b)。マウスにおける Fc γ R を介した免疫反応の活性化は、免疫複合体と活性化型 Fc γ R が結合したときに引き起こされる (Takai, 2005a; Takai, 2005b; Herrada et al., 2007)。マウスの活性化型 Fc γ R である Fc γ RIII は Fc receptor IgG low affinity III (*Fcgr3*) にコードされており、細胞膜/細胞質領域はヒトの Fc γ RIII と、細胞外領域はヒトの Fc γ RII と類似し、Immune receptor tyrosine-based activation motif (ITAM) が結合した共通 γ 鎖を有している (Takai, 2005a; Takai, 2005b; Mechetina et al., 2002; Reth, 1989)。一方、活性化型受容体を介した免疫応答は、*Fcgr2b* にコードされる Fc γ RIIB によって抑制される。この受容体は Immune receptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) が結合しており、ヒトの Fc γ RIIB と高い相同性を示す (Takai, 2005a; Takai, 2005b; Ravetch and Bolland, 2001)。これらの活性化型および抑制型 Fc γ R はマウスの IgG3 サブタイプよりも IgG1、IgG2a および IgG2b

を含有する免疫複合体に高い親和性を示す (Takai, 2005a; Takai, 2005b)。

SLE に対する genome-wide linkage screening において、Fc γ R 遺伝子が存在する領域 (第 1 染色体 q23) と病態との間に有意な連鎖が得られている (Moser et al., 1998; Shai et al., 1999)。また、Fc γ R 遺伝子の多型は SLE の病理発生に影響を与えることが示唆されている (Chu et al., 2004; Kyogoku et al., 2002; Siriboonrit et al., 2003)。すなわち、Fc γ RIIIA の細胞外領域における 158-V/F 多型は受容体と IgG 含有免疫複合体の親和性を変化させる (Koene et al., 1998; Wu et al., 1997)。また、Fc γ RIIIB の NA 1/2 多型解析で、NA 2/2 ホモ接合体の SLE 患者はループス腎炎に陥りやすいことが報告されている (Hatta et al., 1999)。一方、疾患モデル動物では、活性化型 Fc γ RI および Fc γ RIII の両方が機能不全となる共通 γ 鎖欠損マウス、あるいは抑制型 Fc γ RIIB 欠損マウスなどを用いて、自己免疫性糸球体腎炎における Fc γ R の役割が解析されてきた (Bolland and Ravetch, 2000; Clynes et al., 1998; Matsumoto et al., 2003; Takai et al. 1996)。NZB/WF1 の遺伝学的背景を有する共通 γ 鎖欠損マウスの糸球体傷害は NZB/WF1($\gamma^{+/-}$)マウスに比べて軽度であること (Clynes et al., 1998)、C57BL/6 マウスの遺伝学的背景を有する抑制型 Fc γ RIIB 欠損マウスに重篤な糸球体腎炎および脾腫が認められることが報告されている (Bolland and Ravetch, 2000)。以上の知見は、いずれも抑制型および活性化型 Fc γ R の生理機能の変化が自己免疫性糸球体腎炎の病理発生に深く関与することを示唆するものである。

そこで第 2 章では、B6.MRLc1(82-100)マウスよりもさら狭いコンジェニック領域を有する B6.MRLc1(82-86)、B6.MRLc1(92-100)および B6.MRLc1(100)コンジェニックマウスを作出し、各種解析を行うことで、自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子の存在領域を検証した。MRL マウス型の Fc γ R 遺伝子領域を有する B6.MRLc1(92-100)マウスのみが自己免疫性糸球体腎炎を発症し、腎臓および免疫器官における抑制型 Fc γ RIIB および活性化型 Fc

γ RIII のバランスの変化が、B6.MRLc1(92-100)マウスにおける糸球体腎炎発症の一因となっている可能性を示す。

材料および方法

本実験は、北海道大学の動物実験指針に従い、総長の承認を得て行われた（承認番号：8019）。

1. コンジェニックマウスの作出

B6.MRLc1(82-100)コンジェニックマウス作出については前章に述べた。近交系である C57BL/6Cr Slc (C57BL/6) マウスは日本 SLC 社より購入した。動物は室温 $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 20\%$ 、明暗周期 12 時間（午前 7 時点灯、午後 7 時消灯）の環境で、市販試料と水道水を自由摂取させた。C57BL/6 マウスと B6.MRLc1(82-100)マウスを交配させて F1 世代を得た。この F1 マウスを C57BL/6 マウスと戻し交配し、N2 世代を作出した。N2 マウスについて、マイクロサテライトマーカー *D1Mit202*、*D1Mit107*、*D1Mit143*、*D1Mit15*、*D1Mit113* および *D1Mit403* を用いてジェノタイピングを行った（図 2-1）。マイクロサテライトマーカーの染色体上の位置は Mouse Genome Database (MGD, The Jackson Laboratory, <http://www.informatics.jax.org/>) を参考にした。ジェノタイピングによって、*D1Mit202* から *D1Mit143* の領域（82-86 cM）、*D1Mit15* から *D1Mit403* の領域（92-100 cM）、あるいは *D1Mit403* の領域（100 cM）がヘテロ接合体となる 3 種類の個体を選抜した。最終的にヘテロ接合体同士を掛け合わせ、上記の 3 領域が MRL/MpJ マウス型ホモ接合体となる個体を選抜し、B6.MRLc1(82-86)マウス、B6.MRLc1(92-100)マウスおよび B6.MRLc1(100)マウスと命名し、以下の実験に用いた。

2. polymerase chain reaction (PCR)

近交系およびコンジェニックマウスの尾を採取し、ゲノム DNA を得た。尾を Lysis バッファー (50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、20 mM EDTA、1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、100 mg/ml プロテイナーゼ K) 中で、56 °C で一昼夜インキュベートし、フェノール抽出を行った。最終的に、ゲノム DNA をエタノール沈殿で精製し、TE (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) に溶解した。前述のマイクロサテライトマーカーを C57BL/6 マウスと MRL/MpJ マウス間の多型を検出するため用いた。PCR 反応、電気泳動および写真撮影は第 1 章と同様の方法で行った。

3. 組織学的試料作製

1、6 および 12 ヶ月齢のマウスをペントバルビタール (40mg/kg) の深麻酔下において総頸動脈を切断することで放血安楽死させ、腎臓、脾臓および胸腺を採取した。一部の組織は 10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて 72 時間以上室温で浸漬固定し、各種組織学的解析に用いた。残りの組織は OCT コンパウンド (Tissue-tek: Sakura Finetek 社) に包埋後、液体窒素で凍結させ、蛍光抗体法用材料として -80°C で保存した。

4. 腎病理組織学的解析

組織計測によってマウスの糸球体傷害を評価した。6 および 12 ヶ月齢のマウス腎組織切片 (2 μm 厚) に Periodic acid Schiff (PAS) 染色を施し、1 個の腎臓あたり 30 枚のデジタル顕微鏡写真を撮影した。これらの写真から、糸球体における核数および腎小体直径を Image J ver. 1.32j (NIH 社) を用いて計測した。また、一部の切片については膜性病変観察のために Periodic acid Methenamine Silver (PAM) 染色を施し、光学顕微鏡下で観察した。

5. CD3 および B220 に対する免疫組織化学法

脾臓における CD3 (T 細胞マーカー) および B220 (B 細胞マーカー) 陽性細胞の検出を第 1 章と同様の方法で行った。

脾臓における CD3 および B220 陽性面積を計測するため、デジタル顕微鏡写真を 1 個体あたり 35 枚以上撮影し、観察される全ての CD3 あるいは B220 陽性領域の面積を Image J ver. 1.32j (NIH 社) を用いて計測した。

6. IgG、Fc γ R および CD11c に対する免疫蛍光抗体法

腎臓、脾臓および胸腺から 4 μ m 厚の凍結切片を作製後、直ちに風乾した。次いで、4°C のアセトンで 5 分間固定した後、PBS で洗浄した。免疫蛍光抗体法は 100 倍希釈した Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ヤギ抗マウス IgG1 抗体 (Caltag Laboratories 社)、100 倍希釈した Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) 標識ヤギ抗マウス IgG2b 抗体 (Caltag Laboratories 社)、200 倍希釈した未標識ヤギ抗マウス Fc γ RIIB 抗体 (R & D Systems 社) および 200 倍希釈した未標識ヤギ抗マウス Fc γ RIII 抗体 (R & D Systems 社) を用いた。一次抗体とのインキュベーションは室温で 2 時間行った。PBS で洗浄後、Fc γ RIIB と Fc γ RIII の切片は、100 倍希釈した FITC 標識ヤギ抗ラット IgG (Zymed 社) および TRITC 標識ウサギ抗ヤギ IgG (Zymed 社) とそれぞれ反応させた。PBS で洗浄後、切片を水溶性封入剤 (GEL/MOUNT: Biomedica 社) で封入した。Fc γ RIII と CD11c (樹状細胞マーカー) の二重染色のため、切片を抗 Fc γ RIII 抗体と反応させた後に、抗 CD11c 抗体と反応させた。CD11c の一次抗体には 200 倍希釈したハムスター抗マウス CD11c 抗体 (Chemicon 社)、二次抗体には 100 倍希釈した FITC 標識ウサギ抗ハムスター抗体を用いた (Southern Biotechnology Association 社)。これらの切片を共焦点レーザー顕微鏡 Fluoview FV500 (Olympus 社) で観察した。

7. 血清および尿の生化学的解析

血中のグルコース濃度をメディセーフミニ（テルモ社）を用いて計測した。血清中の尿素窒素（BUN）およびクレアチニン濃度を BUN-テスト-ワコー（和光純薬工業、大阪）およびクレアチニンアッセイキット（Cayman Chemical 社、MI、USA）を用いて計測した。血清中抗 dsDNA 抗体濃度の測定は市販の Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットを用いた（ALPHA DIAGNOSTIC INTERNATIONAL 社、San Antonio、USA）。尿中のアルブミンを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で検出した。3 μ l の尿および 1 μ g のウシ血清アルブミン（BSA）を 2 $\times$ SDS サンプル緩衝液（100 mM Tris-HCl pH 6.8、20% glycerol、4% SDS、0.02% bromophenol blue、12% 2-mercaptoethanol）中で 65°C 5 分間インキュベートし、12.5% のポリアクリルアミドゲルで電気泳動した（e-PAGEL: アトー、東京）。泳動は 0.1% SDS を含む Tris-glycine 緩衝液（25 mM Tris pH 8.3、192 mM glycine）中に行った（ゲル 1 枚/20 mA）。ゲルは Quick CBB PLUS（和光純薬工業）で染色した。

8. *Crp*、*Apcs* および *Fcgr* の Reverse transcription (RT) -PCR 法および real-time PCR 法による発現解析

1 および 6 ヶ月齢の C57BL/6 マウスおよび B6.MRLc1(92-100)マウスの腎臓、脾臓および胸腺より、TRIzol reagent（Invitrogen 社、Carlsbad、USA）を用いて total RNA を抽出した。ゲノム DNA 分解のため、精製した total RNA を DNase（ニッポンジーン、富山）と 37°C で 15 分間反応させた。DNase 処理した total RNAs を ReverTra Ace（東洋紡、大阪）および oligo dT primer（Invitrogen 社）を用いて cDNA を合成した。PCR 反応は ExTaq（タカラ社）を用いて、初期変性 95 °C 5 分の後、熱変性 95 °C 40 秒、アニーリング 58 °C 30 秒、伸長反応 72 °C 30 秒の 3 ステップで 40 サイクル行った。表 2-1 にマウスの *Crp*、

Apcs、*Fcgr2b*、*Fcgr3*および*Actb*に対する特異的プライマーの詳細を示した。

定量的 real-time PCR 解析は、腎臓、脾臓および胸腺より得た cDNA、Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix および real-time サーマルサイクラー (MX 3000: Stratagene 社) を用いて行った。マウスの *Crp*、*Apcs*、*Fcgr2b*、*Fcgr3* および *Actb* に対する特異的プライマーは RT-PCR と同様のプライマーを用いた (表 2-1)。PCR の条件は初期変性 95 °C 10 分の後、熱変性 95 °C 10 秒、アニーリング 58 °C 20 秒、伸長反応 72 °C 20 秒を 40 サイクル、熱変性 95 °C 10 秒、アニーリング 58 °C 20 秒、伸長反応 72 °C 20 秒を 1 サイクル行った。非特異的な蛍光シグナルを標準化するため、ROX 色素をそれぞれの反応液に加えた。PCR 反応の増幅特異性は融解曲線によって確認した。核酸のコンタミネーションの確認のためにノンテンプレートコントロールを用意した。*Crp*、*Apcs*、*Fcgr2b* および *Fcgr3* の生データをハウスキーピング遺伝子である *Actb* の値で補正した。また、*Fcgr2b* に対する *Fcgr3* の比率を補正した値から算出し (*Fcgr3/Fcgr2b*)、グラフには C57BL/6 マウスに対する相対値で示した。

9. 統計処理

全てのデータは各群の平均値 $\pm$ 標準誤差 (Mean $\pm$ S.E.) で表した。検定は全てノンパラメトリック法 (Mann-Whitney *U* 検定) で行い、いずれも 5% 以下を有意な差とした。

成 績

3 種類の MRL 由来コンジェニックマウス

図 2-1 はマウスの第 1 染色体テロメア領域の模式図で、遺伝子名およびセントロメアからの遺伝学的距離を MGD に基づいて示す。B6. MRLc1 (82-86) マウスは *Se1* ファミリーの領域が、B6. MRLc1 (92-100) マウスは *Fcgr* ファミリー、*Crp*、*Apcs*、*Ifi200* ファミリーおよび *Exo1* の領域が、B6. MRLc1 (100) マウスは *Exo1* の領域が MRL マウス型となっている。

B6. MRLc1 (92-100) マウスに出現する糸球体腎炎

図 2-2 に C57BL/6 マウス、B6. MRLc1 (82-86) マウス、B6. MRLc1 (92-100) マウスおよび B6. MRLc1 (100) マウスの腎臓光学顕微鏡像を示す。B6. MRLc1 (82-86) マウスおよび B6. MRLc1 (100) マウスは糸球体傷害を示さなかった (図 2-2a-c)。一方、B6. MRLc1 (92-100) マウスは、6 ヶ月齢から増殖性病変を主体とする軽度な糸球体傷害を示した (図 2-2d)。B6. MRLc1 (92-100) マウスの糸球体病変は、12 ヶ月齢において顕著に増悪し、糸球体基底膜の肥厚、内皮細胞の増殖、メサンギウム細胞および基質の増加が認められた (図 2-2e および f)。B6. MRLc1 (92-100) マウスの一部の糸球体は、全節性に PAS 陽性物質の沈着および毛細血管腔の消失など重篤な病変を示し (図 2-2e)、12 ヶ月齢では基底膜のスパイク様構造および二重化を主体とする膜性病変が観察された (図 2-2g および h)。

免疫蛍光抗体法によって、B6. MRLc1 (92-100) マウスの糸球体メサンギウム領域には IgG1 および IgG2b 陽性免疫複合体が観察された (図 2-3b)。一方、C57BL/6 マウスの糸球体においてこのような陽性反応はほとんど観察されなかった (図 2-3a)。

B6. MRLc1 (92-100) マウスに認められた糸球体腎炎発症初期 (6 ヶ月齢) および糸球体腎炎発症期 (12 ヶ月齢) の糸球体傷害を組織計測によって評価した (図 2-4a および b)。

腎小体の直径で、B6. MRLc1 (92-100) マウスは C57BL/6 マウスよりも高値を示し、有意差は 12 ヶ月齢で認められた (図 2-4a)。一方、糸球体の核数では、6 および 12 ヶ月齢において B6. MRLc1 (92-100) マウスが C57BL/6 マウスよりも有意に高値を示した (図 2-4b)。

腎機能評価のため、6 および 12 ヶ月齢の B6. MRLc1 (92-100) マウスおよび C57BL/6 マウスにおける血清中クレアチニン濃度、血清中尿素窒素濃度および尿中へのアルブミン排出を解析した。クレアチニン濃度では、両群間に有意差は認められなかったが、12 ヶ月齢において B6. MRLc1 (92-100) マウスが C57BL/6 マウスよりも高値を示す傾向にあった (図 2-4c)。BUN 濃度では、両月齢において B6. MRLc1 (92-100) マウスが C57BL/6 マウスよりも高値を示し、12 ヶ月齢で有意差が認められた (図 2-4d)。尿中のアルブミンの検出を SDS-PAGE によって解析した。サイズコントロールとして BSA を用いて、約 66kDa のバンドをアルブミンとした。アルブミンのバンドは両系統で検出されたが、とくに 12 ヶ月齢の B6. MRLc1 (92-100) マウスにおいてより強いバンドが認められた (図 2-4e)。

B6. MRLc1 (92-100) マウスにおける免疫機構の活性化

図 2-5a および b に、6 および 12 ヶ月齢における C57BL/6 マウスおよび B6. MRLc1 (92-100) マウスの脾臓重量および血清中抗 dsDNA 抗体濃度を示す。脾臓重量では、12 ヶ月齢において B6. MRLc1 (92-100) マウスが C57BL/6 マウスよりも有意に高値を示した。血清中抗 dsDNA 抗体濃度では、両月齢において B6. MRLc1 (92-100) マウスが C57BL/6 マウスよりも有意に高値を示した。

図 2-5c-f に、糸球体腎炎未発症期 (1 ヶ月齢) の B6. MRLc1 (92-100) マウスおよび C57BL/6 の脾臓における CD3 および B220 に対する免疫組織化学の光学顕微鏡像を示す。両系統において、CD3 陽性反応は動脈周囲リンパ組織鞘に、B220 陽性反応は脾リンパ濾胞に観察された。しかしながら、B6. MRLc1 (92-100) マウスの両陽性領域は C57BL/6 マウス

よりも広く観察された（図 2-5d および f）。CD3 陽性面積および B220 陽性面積の組織計測では、両パラメータ共に B6.MRLc1(92-100)マウスが C57BL/6 マウスよりも有意に高値を示した（図 2-5g および h）。

第 1 染色体 92-100cM における自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子の選抜

マウス第 1 染色体 92.3-100cM は複数の細胞増殖および免疫関連遺伝子を包含している（図 2-1）。これらの遺伝子の中で、B6.MRLc1(92-100)マウスの糸球体腎炎発症に関連する遺伝子を選抜するために、各遺伝子の主要発現臓器における mRNA 相対発現量を B6.MRLc1(92-100)マウスおよび C57BL/6 マウス間で比較した（図 2-6）。観察個体は糸球体腎炎の二次的変化を除外するため、糸球体腎炎未発症齢（1 ヶ月齢）を用いた。ペントラキシファミリーである *Crp* および *Apcs* の発現量を肝臓で解析したが、系統間で有意差は認められなかった（図 2-6）。一方、Fc γ R 遺伝子の発現量を腎臓で解析したところ、B6.MRLc1(92-100)マウスにおける *Fcgr2b* 発現量の減少および *Fcgr3* 発現量の上昇傾向が得られた（図 2-6）。

腎臓、脾臓および胸腺における Fc γ RIIB および Fc γ RIII の局在

腎臓において、Fc γ RIIB および Fc γ RIII 陽性反応は糸球体メサンギウム領域に観察された（図 2-6a、b、h および i）。Fc γ RIIB 陽性反応の強度に系統差は認められなかった（図 2-6a および h）。一方、B6.MRLc1(92-100)マウスの Fc γ RIII 陽性反応は C57BL/6 マウスよりも強く観察された（図 2-6b および i）。脾臓において、Fc γ RIIB および Fc γ RIII 陽性反応は主として脾リンパ濾胞の胚中心部で網状に観察された（図 2-7c、e、j および k）。Fc γ RIII と樹状細胞マーカー（CD11c）の二重染色において両反応の局在は一致した（図 2-8a）。また、腎臓と同様、B6.MRLc1(92-100)マウスの Fc γ RIII 陽性反応は C57BL/6

マウスよりも強く観察された（図 2-7e および k）。胸腺において、Fc γ RIIB 陽性反応は両系統で胸腺皮質および髄質の境界部に存在する細胞に観察され、反応の強さに系統差は認められなかった（図 2-7f および l）。一方、Fc γ RIII 陽性細胞は B6.MRLc1(92-100) マウスにのみ観察され、陽性細胞の形態学的特徴は Fc γ RIIB 陽性細胞と類似しており、楕円形の核および細胞質突起を有していた（図 2-7f、l および m）。また、Fc γ RIII と CD11c の二重染色においてこれらの局在は一致した（図 2-8b）。

腎臓、脾臓および胸腺における *Fcgr2b* および *Fcgr3* mRNA の発現

1 ヶ月齢の C57BL/6 マウスおよび B6.MRLc1(92-100)マウスの腎臓、脾臓および胸腺における Fc γ R 遺伝子および *Actb* の発現を RT-PCR 法で解析した。*Fcgr2b* の発現は両系統の三臓器全てにおいて認められ、その発現に明らかな系統間および臓器間の違いは認められなかった（図 2-9、上段）。一方、*Fcgr3* の発現も両系統の三臓器全てにおいて認められたが、これらの発現は B6.MRLc1(92-100)マウスで C57BL/6 よりも強く認められた。とくに B6.MRLc1(92-100)マウスの脾臓における発現が最も強く認められた（図 2-9、中段）。

糸球体腎炎未発症期（1 ヶ月齢）および発症初期（6 ヶ月齢）の B6.MRLc1(92-100)マウスおよび C57BL/6 マウスの腎臓、脾臓および胸腺における *Fcgr2b* および *Fcgr3* mRNA 発現を定量的 real-time PCR 法で解析した結果を図 2-10 に示す。1 ヶ月齢の相対的 *Fcgr2b* 発現量では、腎臓および脾臓において B6.MRLc1(92-100)マウスが C57BL/6 マウスよりも有意に低い値を示した。一方、胸腺において系統間の有意差は認められなかった（図 2-10a）。対照的に、1 ヶ月齢の相対的 *Fcgr3* 発現量では、全臓器において B6.MRLc1(92-100)マウスが C57BL/6 マウスよりも有意に高値を示した（図 2-10b）。6 ヶ月齢の相対的 *Fcgr2b* 発現では、腎臓および脾臓において B6.MRLc1(92-100)マウスが C57BL/6 マウスよりも低

い値を、胸腺では逆の傾向を示した（図 2-10c）。対照的に、6 ヶ月齢の相対的 *Fcgr3* 発現量では、全臓器において B6.MRLc1(92-100)マウスが C57BL/6 マウスよりも有意に高値を示した（図 2-10d）。以上の所見より、Fc γ R 遺伝子発現の系統差は糸球体腎炎未発症期よりも発症初期で顕著であることが明らかとなった。

1 および 6 ヶ月齢の B6.MRLc1(92-100)マウスおよび C57BL/6 マウスの腎臓、脾臓および胸腺における *Fcgr2b* に対する *Fcgr3* mRNA 相対発現量の比率を図 2-11 に示す。値は C57BL/6 マウスの値を 1 とした相対値で示してある。1 ヶ月齢において、B6.MRLc1(92-100)マウスは C57BL/6 マウスよりも顕著に高値を示し、とくに胸腺でその差が顕著に認められた（図 2-11a）。6 ヶ月齢でも同様の傾向が得られ、とくに腎臓と胸腺で系統差が顕著に認められた（図 2-11b）。

考 察

MRL マウスの第 1 染色体 82-100 cM は自己免疫疾患原因遺伝子座 *Mag* を包含し、当領域は糸球体腎炎、血清中抗 dsDNA 抗体濃度の上昇および脾腫と関連している（第 1 章）。本章では、*Mag* に存在する自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子を同定するために、*Mag* よりもさらに狭い領域（82-86 cM、92-100 cM、100 cM）を含む 3 系統のコンジェニックマウスを作出し、腎臓病理組織像を解析した。過去の報告より、第 1 染色体 82-86 cM において *FasI* (85.0 cM) あるいは *SeI* ファミリー (86.6 cM) と糸球体腎炎発症の関連性が示されている (He et al., 2006; Ito et al., 2003)。また、第 1 染色体 100 cM に存在する *ExoI* は DNA 修復を担っており、MRL/MpJ マウスの精巣に出現するアポトーシスの原因遺伝子として注目されている (Namiki et al., 2005)。解析の結果、3 系統の内、明らかな糸球体傷害は B6.MRLc1 (92-100) マウスにのみ認められた。加えて、B6.MRLc1 (92-100) マウスには糸球体への免疫複合体の沈着、軽度腎機能の悪化、血清自己抗体濃度および脾臓重量の上昇が認められ、B6.MRLc1 (92-100) マウスは明らかに自己免疫性糸球体腎炎を発症していた。以上の結果より、*FasI*、*SeI* ファミリーおよび *ExoI* が糸球体腎炎の病理発生に関連している可能性は低く、自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子は 92.3-100 cM に存在することが示唆された。

マウスの第 1 染色体 92.3-100 cM は免疫複合体に高親和性を示す Fc γ R、炎症性蛋白であるペントラキシンあるいはインターフェロン (IFN) 誘導性蛋白などをコードする複数の免疫関連遺伝子を包含している。主要発現部位における *Fcgrs*、*Crp* および *Apcs* の相対的 mRNA 発現量を C57BL/6 マウスおよび B6.MRLc1 (92-100) マウスの間で比較したところ、B6.MRLc1 (92-100) マウスにおいて *Fcgr2b* 発現量の減少および *Fcgr3* 発現量の上昇が認められたため、Fc γ R に着目し、その局在を検索した。腎臓において、Fc γ RIIB および Fc γ

RIII 陽性反応は糸球体メサンギウム領域に観察された。メサンギウム細胞は間葉由来の食細胞であり、糸球体濾過率の調節、炎症反応および糸球体傷害の病理発生などにおいて重要な役割を果たしている (Floege et al., 1994; Radeke et al., 1990)。活性化したメサンギウム細胞はサイトカインあるいはケモカインなどの炎症性メディエーターを産生する (Fukami et al., 2004; Hora et al., 2002)。健常なマウスのメサンギウム細胞は $Fc\gamma$ RIII よりも主に $Fc\gamma$ RII を発現しているが、リポ多糖 (LPS) あるいは $IFN-\gamma$ 刺激による $Fc\gamma$ RII の発現低下と $Fc\gamma$ RIII の発現上昇が報告されている (Radeke et al., 2002)。本章の結果はこれらの報告と部分的に一致し、B6.MRLc1(92-100)マウスは C57BL/6 マウスよりも強い $Fc\gamma$ RIII 陽性反応を示し、B6.MRLc1(92-100)マウスの腎臓において *Fcgr2b* の低発現および *Fcgr3* の高発現が認められた。以上の知見より、糸球体メサンギウム領域における $Fc\gamma$ RIIB および $Fc\gamma$ RIII のバランス変化が、B6.MRLc1(92-100)マウスの糸球体腎炎病理発生に関与していることが示された。

$Fc\gamma$ R 陽性細胞は脾臓リンパ濾胞および胸腺皮質髄質境界部に観察され、 $Fc\gamma$ RIII および CD11c の二重染色によって樹状細胞と同定された。興味深いことに、腎臓と同様、免疫器官においても B6.MRLc1(92-100)マウスは C57BL/6 マウスよりも強い $Fc\gamma$ RIII 陽性反応および高い *Fcgr3*/*Fcgr2b* 比を示した。近年、 $Fc\gamma$ R は樹状細胞の成熟、食作用および抗原提示能を調節していることが報告されている (Desai et al., 2007; Regnault et al., 1999)。すなわち、 $Fc\gamma$ RIIB は樹状細胞の活性化を抑制し、抗原提示を制限することで末梢の免疫寛容に重要な役割を果たす (Desai et al., 2007)。さらに、ヒトの樹状細胞における活性化型および抑制型 $Fc\gamma$ R のアンバランスは Tumor necrosis factor β (TNF- β) を代表とするサイトカイン産生を誘導し、免疫応答に重要な役割を果たす (Boruchov et al., 2005)。腎臓ではメサンギウム細胞が樹状細胞に似た免疫学的機能を果たし、活性化することで Major histocompatibility complex II (MHCII) および

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) を発現し、抗原提示細胞として直接リンパ球と接触することが示されている (Radeke et al., 1992; Radeke et al., 1994)。それ故、樹状細胞やメサングウム細胞における $\text{Fc}\gamma\text{R}$ のアンバランスは、免疫担当細胞の過度の活性化に起因する抗原提示あるいは免疫複合体除去機構の破綻を引き起こすことで、自己免疫性糸球体腎炎の病理発生に深く関与していると考えられる。

B6.MRLc1 (92-100) マウスの脾臓で、糸球体腎炎発症前から T および B 細胞領域の増加が認められたことは、本マウスにおける免疫系の活性化は糸球体傷害よりも早期に起こることを示唆している。さらに、糸球体腎炎未発症期の免疫器官において、B6.MRLc1 (92-100) マウスの *Fcgr3/Fcgr2b* は顕著に変化していた。 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ は免疫器官の胚中心部において B 細胞の負の選択に関与することが示唆されている。すなわち、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ は B 細胞上に発現し、樹状細胞上の免疫複合体に過剰に反応する B 細胞は $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 依存性のアポトーシスで除去される (Takai, 2005)。また、胎子胸腺細胞上の $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ 発現低下は T 細胞への分化を抑制し、NK 細胞への分化を促進する (Durum et al., 1998)。若齢期における $\text{Fc}\gamma\text{R}$ の機能不全と自己反応性リンパ球の産生との関連性を明らかにすることは、いわゆる自己免疫疾患体質を解明する上で重要な示唆を与えるかもしれない。

近年、MRL マウスを含む複数の自己免疫疾患モデルマウスにおいて、*Fcgr2b* の低発現を誘導するプロモーター領域多型の存在が報告されている (Xiu et al., 2005)。一部の SLE 患者においても、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ のプロモーター領域多型 (-343 G/C) に起因する $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ の発現低下が報告されている (Blank et al., 2005)。本研究でも、B6.MRLc1 (92-100) マウスの *Fcgr2b* 相対発現量は C57BL/6 マウスよりも低値だった。それ故、*Fcgr2b/Fcgr3* のアンバランスの原因の一つは *Fcgr2b* プロモーター領域多型にあると考えられる。一方、B6.MRLc1 (92-100) マウスにおける *Fcgr3* の高発現は *Fcgr2b* の低発現よりも著明に認められた。NZB/WF1 の遺伝学的背景を有する共通 γ 鎖欠損マウスは活性化型 $\text{Fc}\gamma\text{R}$ の機能不

全を呈し、糸球体への免疫複合体沈着の程度は変化しないが、糸球体の炎症反応が欠如している (Clyne et al., 1998)。さらに、Fc γ RIII 欠損マウスは抗糸球体基底膜抗体投与による自己免疫性糸球体腎炎に抵抗性を示すことから、Fc γ RIII が糸球体の炎症反応において主要な役割を担うことが知られている (Fujii et al., 2003)。これらの知見より、マウスの自己免疫性糸球体腎炎では、Fc γ RIII の活性化が糸球体の炎症性カスケードを誘導するために不可欠であると考えられる。しかしながら、自己免疫性糸球体腎炎における Fc γ RIII の役割にはヒトとマウスの間において明らかな矛盾が存在する。すなわち、マウスではより機能的な Fc γ RIII が糸球体腎炎を誘導すると考えられるが、ヒトでは Fc γ RIII の機能不全、とくに Fc γ RIIIA の 158-V/F 多型による受容体と免疫複合体の親和性の低下が SLE 発症と関連している (Koene et al., 1998; Wu et al., 1997)。これらを総合的に考えるならば、自己免疫性糸球体腎炎モデルマウスでは、Fc γ R と免疫複合体の親和性よりも Fc γ R バランスの変化が糸球体腎炎発症に大きな影響を持つ。

マウス第 1 染色体 92-100cM は Fc γ R 遺伝子のみならず、*Crp* あるいは *Apcs* (94.2 cM) など複数の免疫関連遺伝子を包含している。しかしながら、相対発現量解析において、これらの遺伝子と自己免疫性糸球体腎炎の間に有意な関連性を見出すことはできなかった。また、95.2 cM には *Ifi200* 遺伝子群が存在し、NZB 系統における *Ifi202* のプロモーター領域多型は *Nba2* 自己免疫疾患遺伝子座の原因とされている (Hatwood et al., 2006; Rozzo et al., 2001)。一方で、*Ifi202* の自己免疫性糸球体腎炎への関与には異論があり、C57BL/6 マウスに *Nba2* 領域を導入したコンジェニックマウスにおいて糸球体腎炎の発症は確認されていない (Henry and Mohan, 2005)。また、マウスの *Ifi202* と相同性を有するヒトの *IFI16* と自己免疫性糸球体腎炎との関連性を明確に証明した報告はない。しかし、*Ifi200* 遺伝子群間で相互の機能不全を補う作用も報告されているため (Wang et al., 1999)、*Ifi202* と自己免疫性糸球体腎炎との関連性を検索していくには *Ifi200* 遺伝子群

全体を網羅的に評価していく必要があるだろう。

結論として、MRL 型の第 1 染色体 92.3-100 cM を有する B6.MRLc1(92-100) コンジェニックマウスにおいて自己免疫性糸球体腎炎が認められ、原因遺伝子は当領域に存在することが明らかとなった。とくに、92.3 cM に存在する活性化型および抑制型 $Fc\gamma R$ 遺伝子発現のバランス変化が自己免疫性糸球体腎炎の発症に関与していると考えられた。

小 括

自己免疫疾患モデルマウスである MRL/MpJ マウスの第 1 染色体テロメア領域 (82-100 cM) を有する B6.MRLc1 (82-100) マウスには自己免疫性糸球体腎炎が認められる。当遺伝子導入領域 *Mag* には自己免疫性糸球体腎炎の原因遺伝子が存在する。第 2 章では、B6.MRLc1 (82-100) マウスよりもさらに狭い遺伝子導入領域を有するコンジェニックマウス B6.MRLc1 (82-86, 92-100, 100) を新たに 3 系統作出し、雌個体の各臓器より新鮮凍結組織、光顕試料および total RNA を採取し、組織学的および分子生物学的手法により対照群 (C57BL/6 マウス) のそれと比較解析した。

3 系統の内、B6.MRLc1 (92-100) マウスにのみ免疫複合体の沈着を伴う糸球体傷害が認められ、脾臓重量および血中自己抗体濃度は C57BL/6 マウスよりも高値を示した。さらに、12 ヶ月齢の B6.MRLc1 (92-100) マウスにおいて血中 BUN 濃度および尿中アルブミン排出の増加が認められ、軽度の腎機能悪化が示唆された。これらの結果より、自己免疫性糸球体腎炎の原因遺伝子は 92-100cM に存在することが明らかとなった。

次いで、92-100 cM に存在する遺伝子、*Crp*、*Apcs*、*Fcgr2b* および *Fcgr3* の主要臓器における相対発現量を B6.MRLc1 (92-100) マウスおよび C57BL/6 マウス間で比較したところ、B6.MRLc1 (92-100) マウスにおいて *Fcgr2b* の低発現および *Fcgr3* の高発現が認められた。*Fc γ RIIB* および *Fc γ RIII* の腎臓、脾臓および胸腺における局在を免疫組織化学的に検索したところ、糸球体メサンギウム領域および樹状細胞に陽性反応が観察され、とくに B6.MRLc1 (92-100) マウスの *Fc γ RIII* 陽性反応は C57BL/6 マウスよりも強かった。糸球体腎炎未発症期 (1 ヶ月) および発症初期 (6 ヶ月) の B6.MRLc1 (92-100) マウスにおける *Fc γ R* 遺伝子の相対的 mRNA 発現量を腎臓、脾臓および胸腺で解析したところ、全臓器で *Fcgr3* の高発現および *Fcgr3/Fcgr2b* 比の上昇が認められた。

以上の結果より、MRL マウス由来自己免疫性糸球体腎炎の原因遺伝子は第 1 染色体約 92-100 cM に存在し、当領域に含まれる抑制型および活性化型 Fc γ R 遺伝子 (92.3 cM) のバランス変化が B6.MRLc1 (92-100) マウスの自己免疫性糸球体腎炎の病理発生に深く関与することが強く示唆された。

図および表

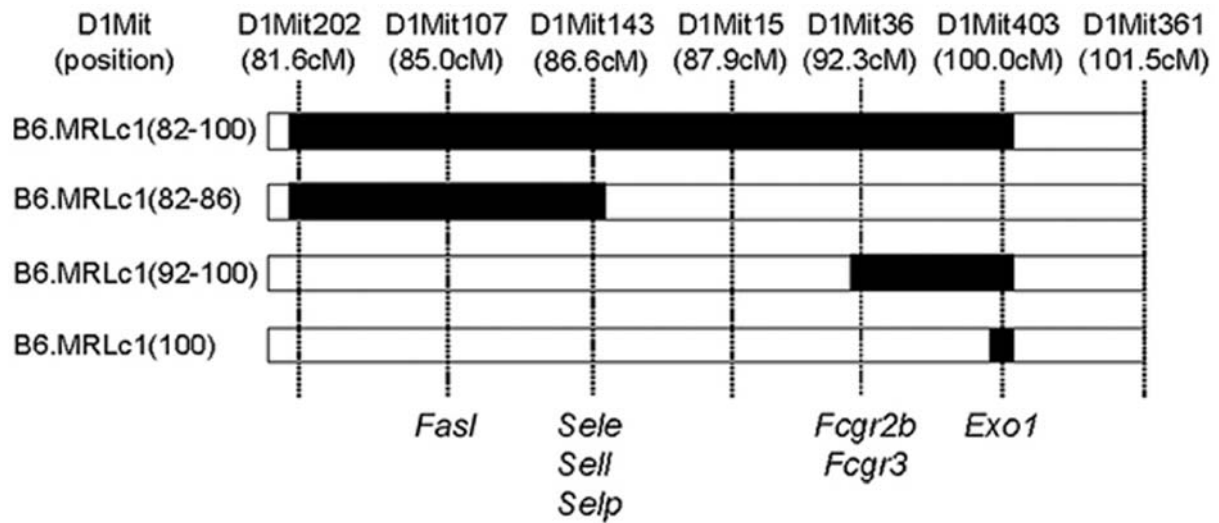


Fig. 2-1. Representation of the telomeric region of chromosome 1 in MRL-derived congenic mice. The upper row shows the B6.MRLc1(82-100) congenic mice produced using *Mag* markers that were reported previously (chapter 1). The 3 new congenic strains developed in the present study are shown in the subsequent rows: B6.MRLc1(82-86), B6.MRLc1(92-100), and B6.MRLc1(100). The microsatellite markers used for genotyping and their positions (cM) are indicated at the top. The MRL-type congenic intervals are represented by black boxes. Some immune- or cell proliferation-associated genes contained congenic intervals, such as the Fas ligand (*FasI*), selectin endothelial (*Sele*), selectin lymphocyte (*Sell*), selectin platelet (*Selp*), Fc receptor IgG low affinity (*Fcgr*), and exonuclease1 (*Exo1*), are indicated at the bottom.

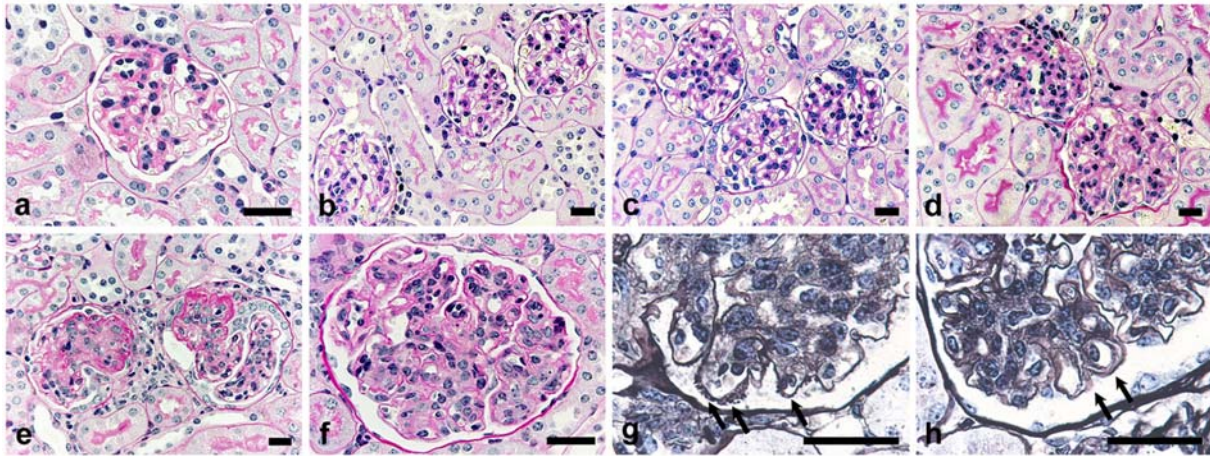


Fig. 2-2. Light micrographs of the renal cortices from C57BL/6 and MRL-derived congenic mice. (a) 12-month-old female C57BL/6 mice, (b) 8-month-old female B6.MRLc1(82-86) mice, (c) 8-month-old female B6.MRLc1(100) mice, (d) 6-month-old female B6.MRLc1(92-100), (e-h) 12-month-old female B6.MRLc1(92-100) mice. B6.MRLc1(82-86) and B6.MRLc1(100) mice have normal renal structures similar to C57BL/6, and their glomeruli present no histopathological changes (panels a-c). B6.MRLc1(92-100) exhibit proliferative glomerular lesions that mainly comprise proliferation of mesangial cells and expansion of mesangial matrices, and these lesions deteriorate with age (panels d-f). Glomeruli of B6.MRLc1(92-100) mice at 12 months reveal membranous lesions such as thickening of the glomerular basement membrane (GBM), spike-like alternations and a double contour of GBM (arrows; panels g and h). Certain glomeruli of B6.MRLc1(92-100) exhibit global deposition of PAS-positive material and the disappearance of capillary and capsular lumina (panel e). PAS (panels a-f) and PAM stained (panels g and h) cortices. Scale bars, 20 μ m.

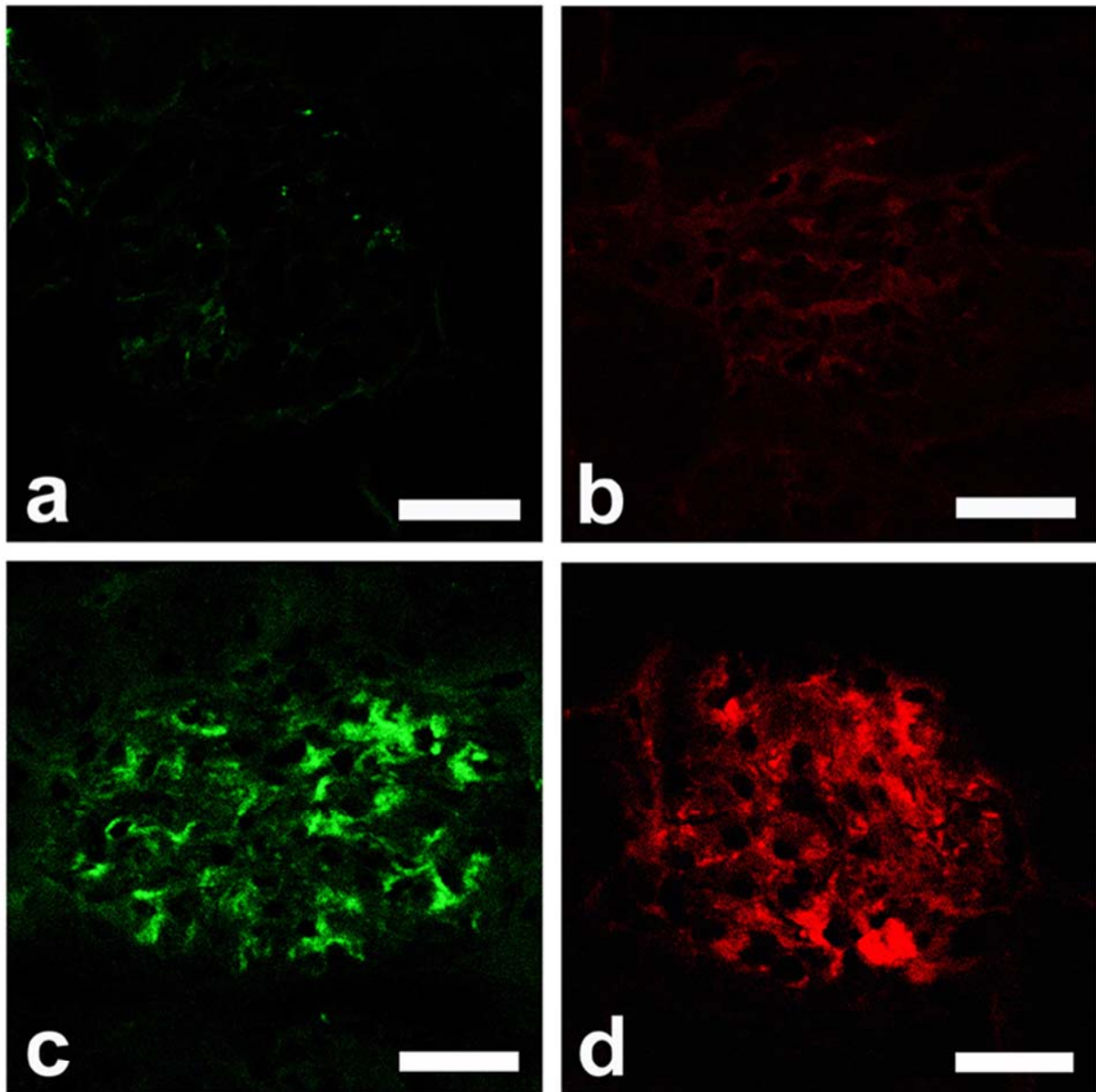


Fig. 2-3. Direct immunofluorescence on cryostat sections for detecting IgG subtypes in glomeruli from 6-month-old C57BL/6 and B6.MRLc1(92-100) mice. The sections were analyzed by confocal microscopy. IgG1-positive reactions are visualized using FITC-conjugated antibodies (green; panels a and c). IgG2b-positive reactions are visualized using TRITC-conjugated antibodies (red; panels b and d). Clear immunoreactions of IgG1 and IgG2b are observed in the mesangial regions of a 6-month-old B6.MRLc1(92-100) (panels c and d); however, these reactions are very weak in corresponding C57BL/6 mice of the same age (panels a and b). Scale bars, 20 μ m.

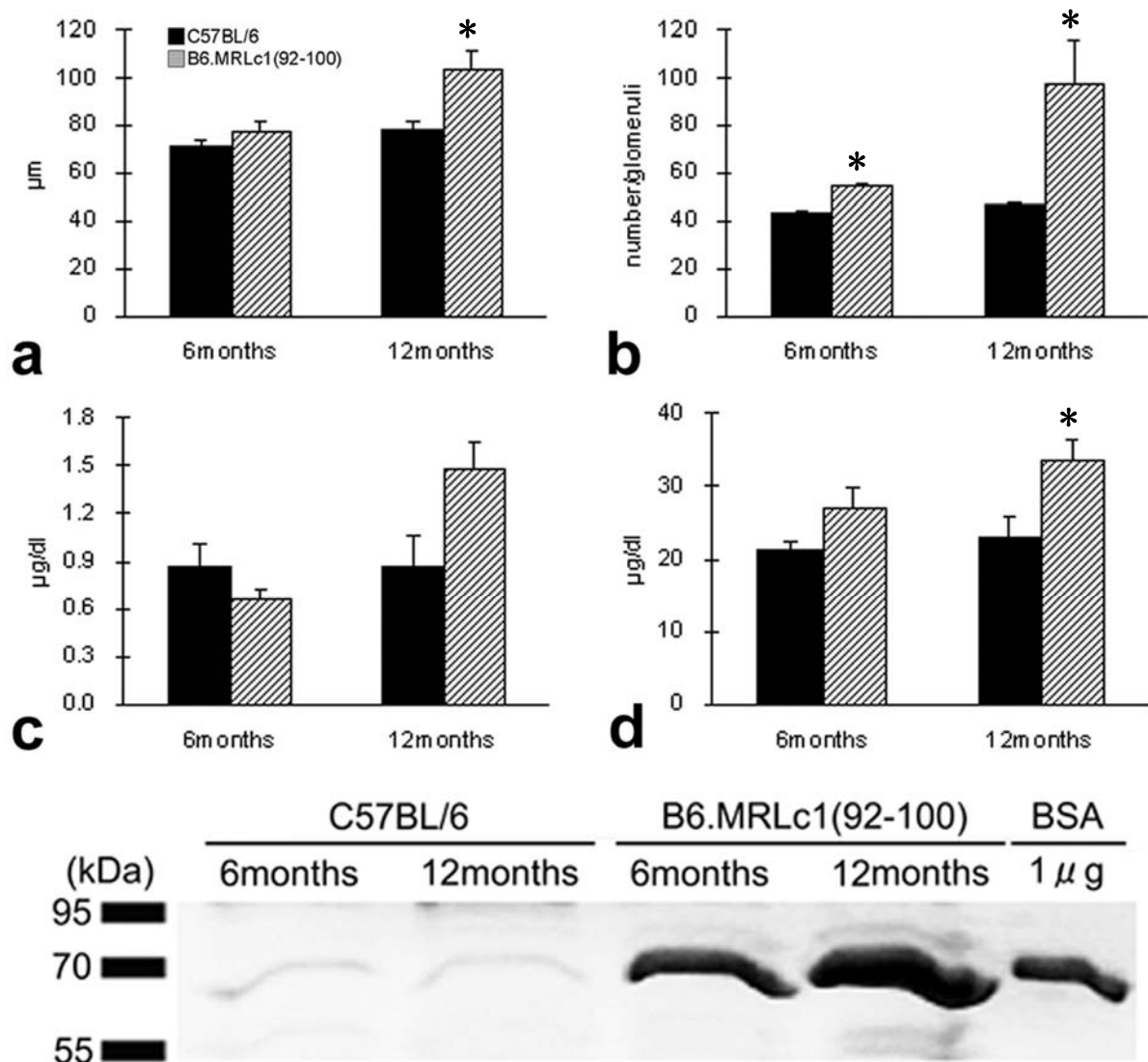


Fig. 2-4. Comparison of the indices for glomerulonephritis between C57BL/6 and B6.MRLc1(92-100) mice at 6 and 12 months of age. (a) Diameter of the renal corpuscle. (b) Number of nuclei present in the glomeruli. (c) Serum levels of creatinine. (d) Serum levels of blood urea nitrogen. Each value represents the mean $\pm$ S.E. *: Significantly different from C57BL/6 of the same age (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$). $n \geq 3$. (e) Detection of urinary albumin. We analyzed 3 μl of urine from C57BL/6 and B6.MRLc1(92-100) by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. As the control, 1 μg of bovine serum albumin was used.

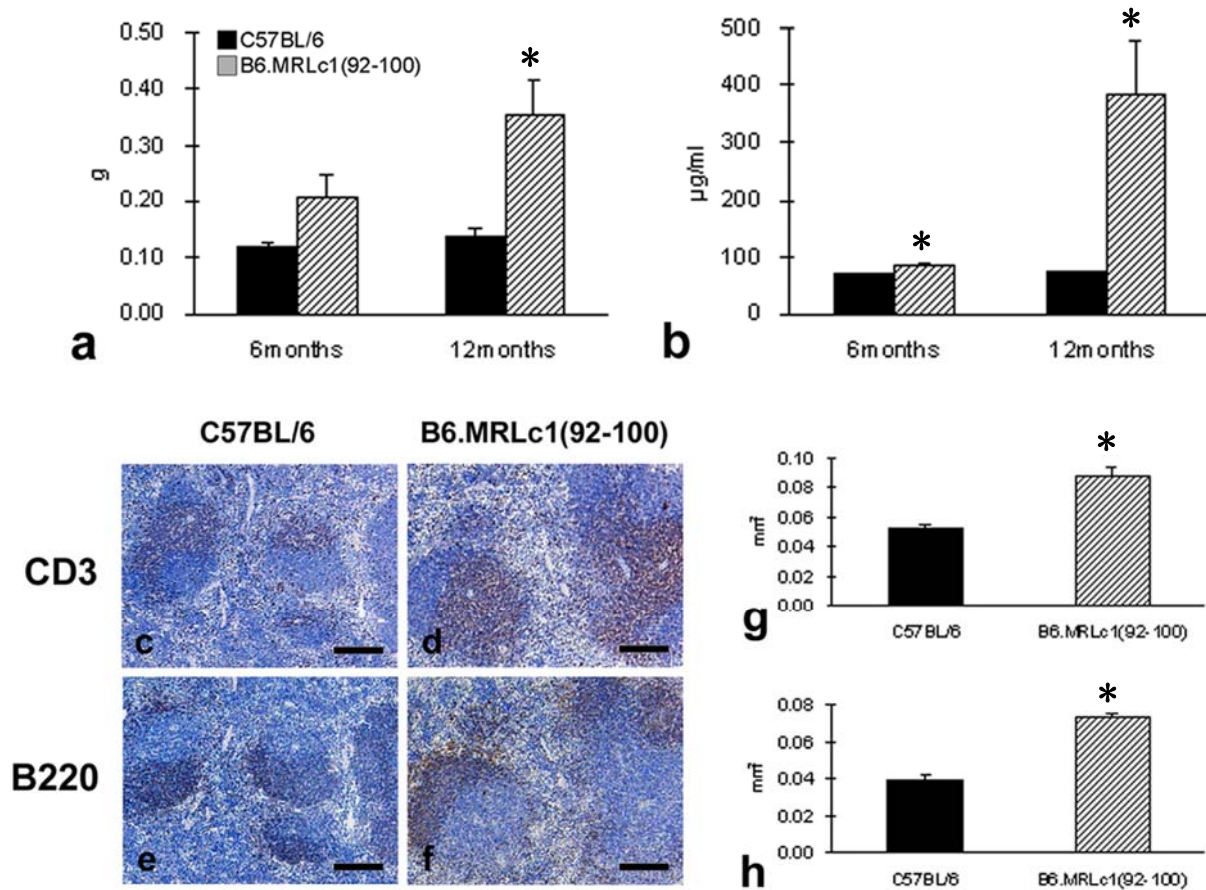


Fig. 2-5. Comparisons of the indices for development of autoimmune disease between C57BL/6 and B6.MRLc1(92-100). (a) Spleen weight. (b) Serum levels of anti-dsDNA antibody. Each value represents the mean $\pm$ S.E. *: Significantly different from C57BL/6 mice of the same age (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$). $n \geq 3$. (c-f) Immunohistochemical detection of CD3- and B220-positive cell areas in spleens obtained from 1-month-old C57BL/6 and B6.MRLc1(92-100) mice. CD3- and B220-positive areas were mainly observed in the periarteriolar lymphatic sheath and splenic lymphoid follicles, respectively. Notably, both CD3- and B220-positive cell areas in B6.MRLc1(92-100) (panels d and f) are more widely observed than in C57BL/6 (panels c and e). Scale bars, 100 μ m. (g and h) Histoplanimetric analysis for CD3- and B220-positive areas in spleens at 1 month of age. Each value represents the mean $\pm$ S.E. *: Significantly different from C57BL/6 (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$). $n \geq 5$.

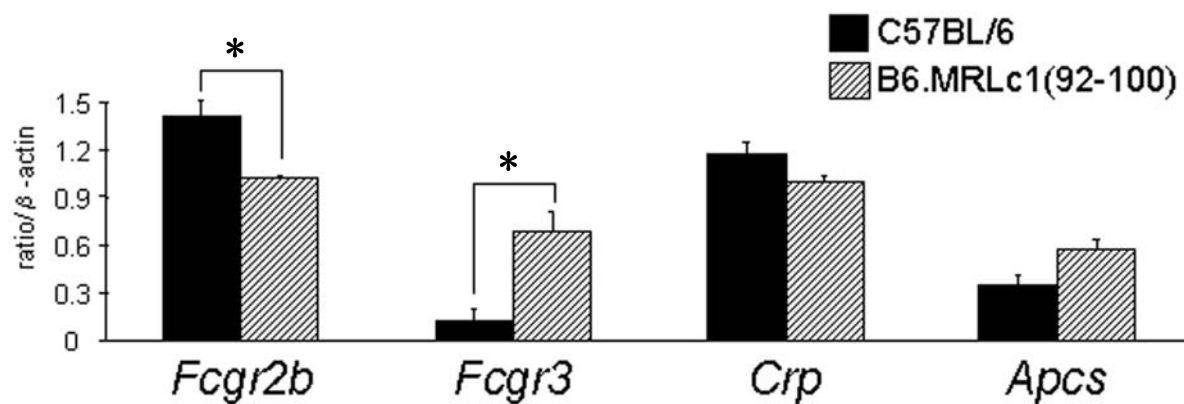


Fig. 2-6. Comparison of relative *Fcgr2b* and *Fcgr3* mRNA expression in the kidney and relative *Crp* and *Apcs* mRNA expression in the liver among 1-month-old B6.MRLc1(92-100) and C57BL/6 mice by quantitative real-time PCR analysis. Each value is normalized by that of β -actin and represents the mean $\pm$ S.E. *: Significantly different from C57BL/6 (Mann-Whitney *U* test, $p < 0.05$). $n \geq 3$.

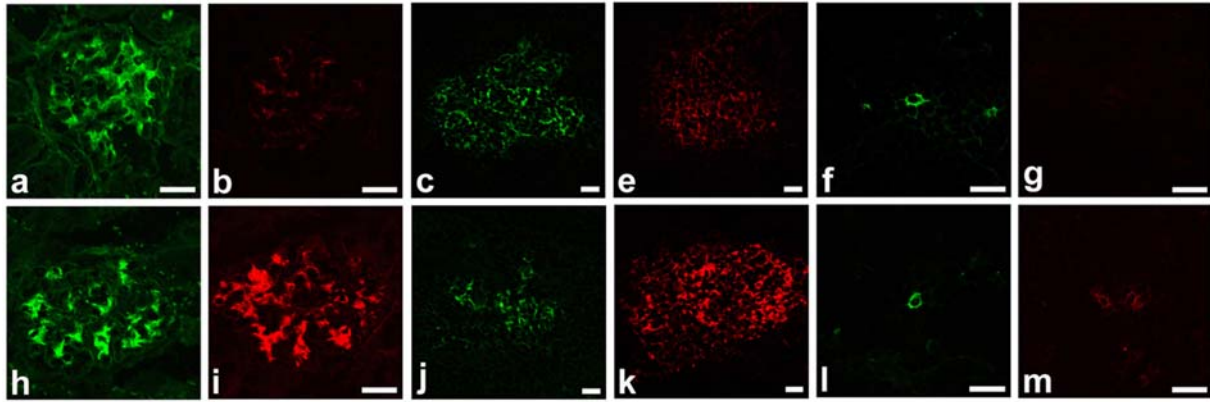


Fig. 2-7. Indirect immunofluorescence on cryostat sections for the detection of Fc γ RIIB and Fc γ RIII in 6-month-old mice. Kidney (a, b, h, i), spleen (c, e, j, k), and thymus (f, g, l, m). The sections are analyzed by confocal microscopy. Fc γ RIIB-positive reactions are visualized using an anti-mouse Fc γ RIIB primary antibody and FITC-conjugated secondary antibody (green; panels a, h, c, j, f, l). Fc γ RIII-positive reactions are visualized using an anti-mouse Fc γ RIII primary antibody and TRITC-conjugated secondary antibody (red; panels b, i, e, k, g, m). In the kidney, Fc γ RIIB-positive and Fc γ RIII-positive reactions are observed in the glomerular mesangial regions in C57BL/6 (panels a and b) and B6.MRLc1(92-100) (panels h and i), and the intensity of the Fc γ RIII-positive reaction in B6.MRLc1(92-100) (panel i) is stronger than that in C57BL/6 (panel b). In the spleen, reticular Fc γ RIIB- and Fc γ RIII-positive reactions are observed in the germinal centers of the splenic lymph follicles in C57BL/6 (panels c and e) and B6.MRLc1(92-100) (panels j and k), and the intensity of Fc γ RIII-positive reactions in B6.MRLc1(92-100) (panel k) is stronger than in C57BL/6 (panel e). In the thymus, Fc γ RIIB-positive reactions represent a single cell that localized on the boundary between the thymic cortex and medulla, and has elliptic nuclei and processed cytoplasm (panels f and l). Fc γ RIII-positive cells are observed in B6.MRLc1(92-100) exclusively and the morphological features of these cells resemble those of Fc γ RIIB-positive cells (panel m). Scale bars, 20 μ m.

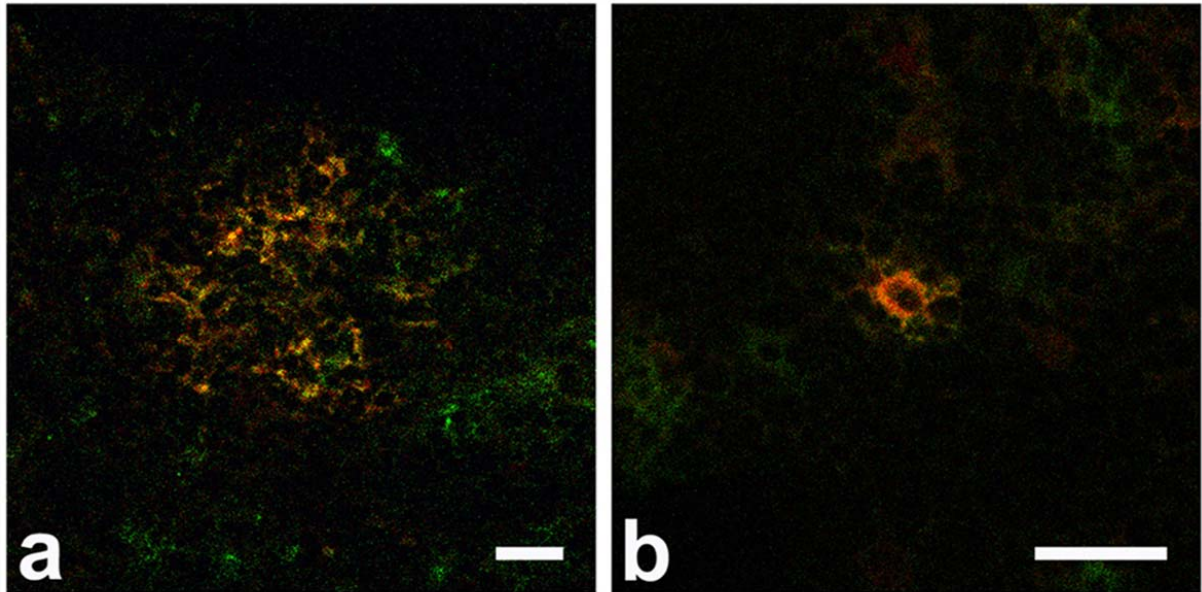


Fig. 2-8. Double immunofluorescence on cryostat sections for the detection of CD11c and Fc γ RIII in 6-month-old B6.MRLc1(92-100) mice. Spleen (a) and thymus (b). The sections are analyzed by confocal microscopy. CD11c-positive reactions are visualized using an anti-mouse CD11c primary antibody and FITC-conjugated secondary antibody (green). Fc γ RIII-positive reactions are visualized using an anti-mouse Fc γ RIII primary antibody and TRITC-conjugated secondary antibody (red). In spleen, reticular CD11c-positive and Fc γ RIII-positive reactions are shown to be colocalized (yellow; panel a). In thymus, the immune-positive reactions of Fc γ RIII and CD11c are fused in a cell having processed cytoplasm (yellow; panel b). Scale bars, 20 μ m.

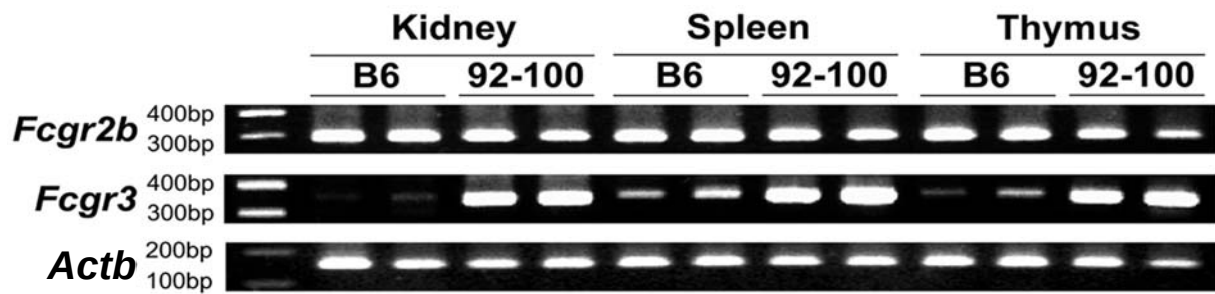


Fig. 2-9. RT-PCR analysis for *Fcgr2b*, *Fcgr3*, and β -*actin* mRNA expression in the kidney, spleen, and thymus of 6-month-old B6.MRLc1(92-100) and C57BL/6 mice. The upper lane (*Fcgr2b*), middle lane (*Fcgr3*), and bottom lane (*Actb*). Size markers are represented on the left. n = 2. B6: C57BL/6. 92-100: B6.MRLc1(92-100).

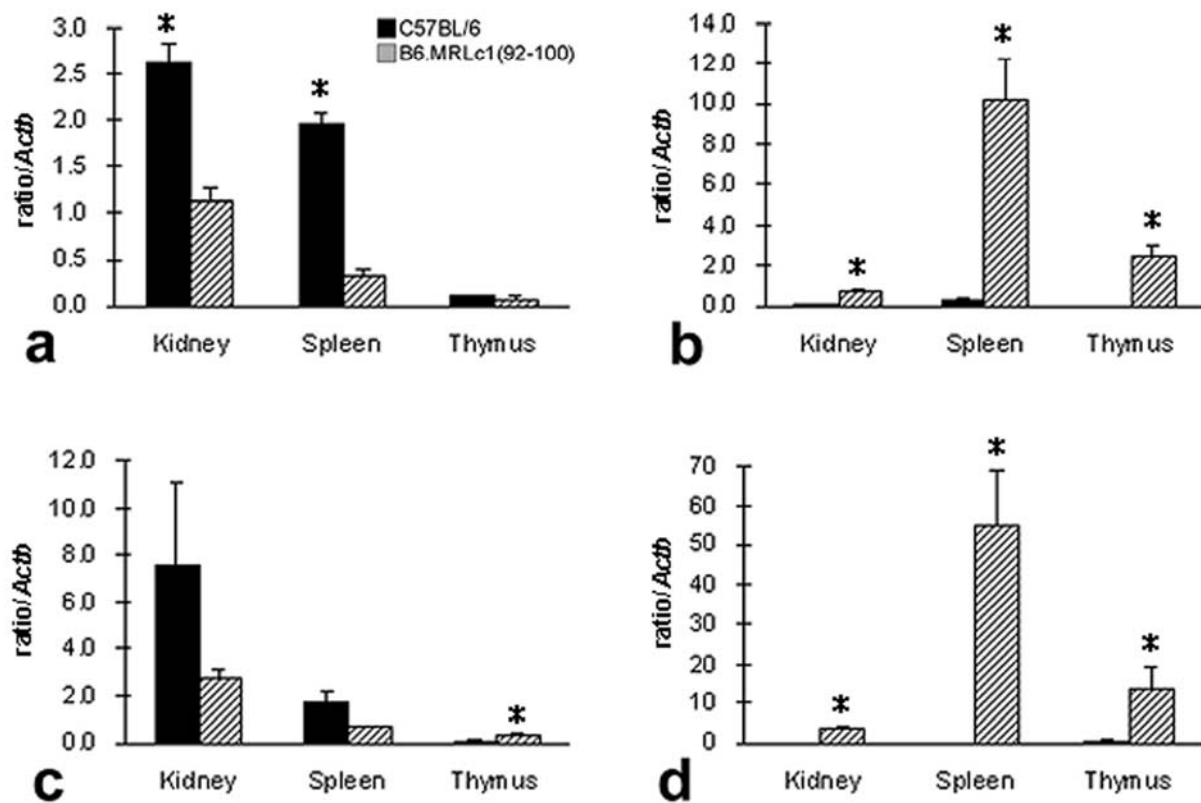


Fig. 2-10. Comparison of relative *Fcgr2b* and *Fcgr3* mRNA expression in the kidney, spleen, and thymus among 1- and 6-month-old B6.MRLc1(92-100) and C57BL/6 mice by quantitative real-time PCR analysis. (a) *Fcgr2b* at 1 month of age. (b) *Fcgr3* at 1 month of age. (c) *Fcgr2b* at 6 months of age. (d) *Fcgr3* at 6 months of age. Each value of *Fcgr2b* and *Fcgr3* is normalized by that of β -actin and represents the mean $\pm$ S.E. *: Significantly different from C57BL/6 (Mann-Whitney *U* test, $p < 0.05$). $n \geq 3$.

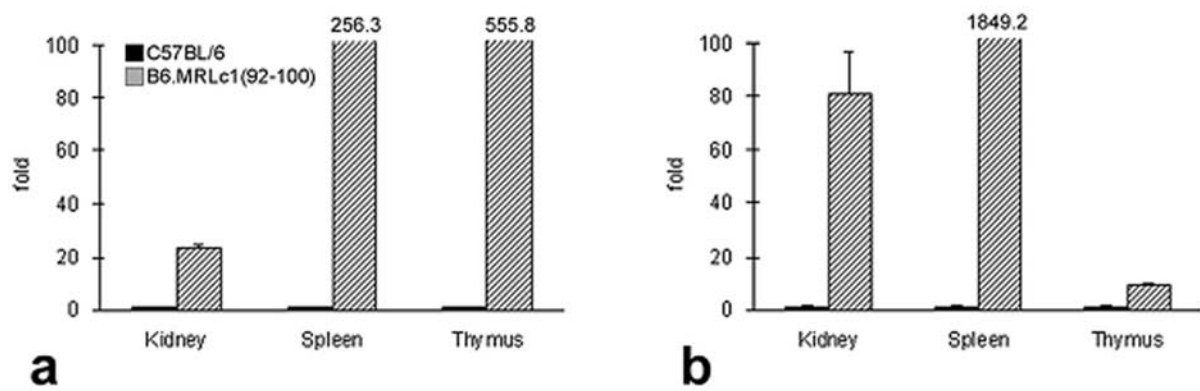


Fig. 2-11. The ratios of relative mRNA expression of *Fcgr3* to that of *Fcgr2b* in 1- and 6-month-old B6.MRLc1(92-100) and C57BL/6 mice. (a) 1 month of age. (b) 6 months of age. Raw values of *Fcgr2b* and *Fcgr3* are normalized by that of *Actb* and values are expressed as fold increases compared to C57BL/6 mice. Each value represents the mean $\pm$ S.E. $n \geq 3$.

Table 2-1. Summary of gene-specific primer pairs.

Genes (Gene ID)		Primer Sequence (Primer Position)	Product Size
<i>Crp</i> (NM_007768.4)	Forward	5' - CCATAGCCATGGAGAAGCTA -3' (64-83)	387bp
	Reverse	5' - TCTACAATCCCCGTAGCAGA -3' (432-451)	
<i>Apcs</i> (NM_011318.1)	Forward	5' - CACCACACTTTTGTTCACA -3' (98-117)	378bp
	Reverse	5' - TCTTCCATACCACGACTGT -3' (457-476)	
<i>Fcgr2b</i> (NM_001077189.1)	Forward	5' - CTGAGGCTGAGAATACGATC -3' (1000-1019)	307bp
	Reverse	5' - GTGGATCGATAGCAGAAGAG -3' (1287-1306)	
<i>Fcgr3</i> (NM_010188.4)	Forward	5' - ATCACTGTCCAAGATCCAGC -3' (652-671)	346bp
	Reverse	5' - GCCTTGAAGTGGTGATCCTA -3' (978-997)	
<i>Actb</i> (NM007393)	Forward	5' - TGTTACCAACTGGGACGACA -3' (304-323)	165bp
	Reverse	5' - GGGGTGTTGAAGGTCTCAA -3' (449-468)	

第 3 章

自己免疫性糸球体腎炎の性差の解析

緒 言

免疫機構は感染防御および免疫寛容の成立など生体必須のメカニズムを担っているが、その機構において性差があることが知られている。ヒトでは、細胞性免疫、液性免疫あるいは細菌感染に対する抵抗性が性によって異なり、とくに女性が強い免疫応答を示す (Bouman et al., 2005)。興味深いことに、この免疫機構の性差は自己免疫疾患の病理発生にも多大な影響を与えている。全身性エリテマトーデス (SLE)、シェーグレン症候群、橋本病およびリウマチ性関節炎は代表的な自己免疫疾患であるが、それぞれの発症割合は女性：男性で 9:1、9:1、10:1 および 4:1 である (Ahmed et al., 1999; Soto et al., 2004; Grimaldi et al., 2005)。また、女性 SLE 患者の病勢は妊娠、閉経あるいは抗癌剤に起因する卵巣機能不全など、性ホルモンバランスが変化する状態において悪化する (Cutolo et al., 2004; Yacoub Wasef et al., 2004; Bouman et al., 2005; Zandman-Goddard et al., 2007)。一方、男性が SLE を発症した場合は女性よりも重篤な病態を示し、典型的な皮膚病変、漿膜炎および重篤な腎病変を呈する (Yacoub Wasef et al., 2004; Zandman-Goddard et al., 2007)。このように、免疫機構ならびに自己免疫疾患の病態には性が深く関与しており、性ホルモンあるいは性染色体が性差発現の直接的な原因となっていると考えられる。

自己免疫疾患モデル動物においても病態形成には雌雄差が認められる。これまで、代表的なモデルマウスである (NZB X NZW)F1 (NZB/WF1) マウスおよび BXSB マウスにおいて、自己免疫糸球体腎炎の雌雄差に関する研究がなされてきたが、雌雄差の傾向はモデルマウスの系統によって異なっている。すなわち、雌の NZB/WF1 マウスは、短命、高抗核抗体濃度および重度糸球体腎炎など、雄よりも重篤な病態を呈する (Bell et al., 1973; Steward and Hay, 1976; Papoian et al., 1977; Roubinian et al., 1977)。一

方、BXSb マウスでは、雄が雌よりも重篤な糸球体腎炎を呈し、この雌雄差において Y chromosome autoimmune acceleration (*Yaa*) 遺伝子の関与が示唆されてきた (Izui et al., 1994)。最近の研究によって、*Yaa* 遺伝子とは X 染色体上の RNA 受容体をコードする Toll-like receptor 7 (*Tlr7*) 遺伝子であり、BXSb マウスはこの遺伝子を Y 染色体上にも有しており、この重複が BXSb マウスの雌雄差を決定していることが明らかとなった (Pisitkun et al., 2006)。一方、MRL-*Fas*^{*lpr*} (MRL-*lpr*) マウスの自己免疫疾患の雌雄差の傾向については異論が多く、ある研究では雌が雄よりも重篤な糸球体傷害および高い自己抗体価を示す結果が得られているが (Rudofsky et al., 1984; Stetler et al., 1985)、他の研究では MRL-*lpr* の病態に雌雄差が認められないことを報告している (Andrews et al., 1978; Wang et al., 1997; Misu et al., 2007)。このように、マウスの遺伝学的背景は自己免疫疾患の病態の雌雄差に多大な影響を与えている。

第 1 章および第 2 章において、著者は MRL マウス由来の自己免疫性糸球体腎炎モデルである B6.MRLc1 (82-100) マウスを作出し、自己免疫性糸球体原因遺伝子は 92.3-100cM に存在することを明らかにした。さらに、B6.MRLc1 (82-100) マウスの糸球体傷害値、IgG 陽性糸球体数および血清中抗 dsDNA 抗体濃度において著明な雌雄差が認められ、いずれも雌が雄よりも高値を示すことも明らかとした。このような B6.MRLc1 (82-100) マウスの自己免疫性糸球体腎炎における性差は性ホルモンの影響を深く受けていると考えられるが、これまでその評価には至っていなかった。上述のように、従来、自己免疫疾患モデルマウスにおける性差発現メカニズムの解析は、NZB、BXSb および MRL 系統などの自然発症モデルマウスを用いて行われてきた。しかしながら、これらの自然発症モデルマウスは多数の自己免疫疾患原因因子を有するため、性ホルモンが自己免疫性糸球体腎炎の病理発生に与える影響を正確に評価することは非常に困難である。一方、B6.MRLc1 (82-100) マウスはコンジェニックマウスであるため、*Mag* 以外の二次的因子の影響を受けにくく、性

ホルモンが自己免疫性糸球体腎炎の病態に与える影響をより直接的に反映できる有用な疾患モデルマウスであると考えられる。

第3章では、B6.MRLc1(82-100)マウスに性腺摘出術を施し、その影響を評価することで、性ホルモンが自己免疫性糸球体腎炎の病態に与える影響について考察した。これらの解析により、B6.MRLc1(82-100)マウスの自己免疫性糸球体腎炎では、とくに雄性ホルモンが病態制御に重大な役割を果たしていることを示す。

材料および方法

本実験は、北海道大学の動物実験指針に従い、総長の承認を得て行われた（承認番号：8019）。

1. 擬手術群および性腺摘出群の作出

B6.MRLc1(82-100)マウスの作出については第1章で述べた。動物は室温 $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 20\%$ 、明暗周期 12 時間（午前 7 時点灯、午後 7 時消灯）の環境で、市販試料と水道水を自由摂取させた。雌雄 1 ヶ月齢の B6.MRLc1(82-100)マウスに、ケタミン（75 mg/kg）およびメデトミジン（1 mg/kg）を腹腔内注射し、麻酔下で擬手術あるいは性腺摘出術を施した。術後の覚醒はアチパメゾール（2 mg/kg）の腹腔内注射で行った。これらの動物を用いて、雌雄共に擬手術群（n = 3）および性腺摘出群（n = 3）を作出し、2 週間ごとに体重を測定した。

2. 性ホルモン濃度の測定

血清中のテストステロンおよびエストロゲン濃度を、テストステロン Enzyme immunoassay (EIA) キット (Cayman Chemical 社) およびエストロゲン EIA キット (Cayman Chemical 社) を用いて、商品説明書の指示に従い測定した。

3. 材料の採取

8 ヶ月齢の擬手術群および性腺摘出群のマウスの尿を採取後、深麻酔下で総頸動脈を切断することで放血安楽死させ、血清、腎臓、脾臓および胸腺を採取した。一部の組織は 10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて 72 時間以上室温で浸漬固定し、パラフィン包埋後、

各種組織学的解析に用いた。残りの組織は RNA later (Ambion 社) 中で total RNA を抽出するまで-30℃で保存した。

4. 腎病理組織学的解析

擬手術群および性腺摘出群の光顕試料から組織切片 (2 μm) を作製し、Periodic acid Schiff (PAS) 染色を施した後、第 2 章と同様の方法で糸球体傷害を評価した。

5. 腎臓、胸腺および脾臓における免疫組織化学的解析

第 1 章と同様の方法で IgG2b 陽性糸球体の検出および計測を行った。第 2 章と同様の方法で、腎臓、胸腺および脾臓における CD3 (T 細胞マーカー) および B220 (B 細胞マーカー) 陽性細胞の検出を行った。

腎臓の免疫染色切片を用いて、CD3 陽性糸球体率を計測した。すなわち、各免疫染色切片上で CD3 陽性反応を示す糸球体の数 (A) を計測し、次いで、免疫染色切片と連続になる PAS 染色切片上の全腎小体数 (B) を計測し、 $A \times 100/B$ を CD3 陽性糸球体率として算出した。また、第 2 章と同様の方法で、脾臓における CD3 および B220 陽性面積の計測を行った。

6. 血清および尿の生化学的解析

血清中の尿素窒素 (BUN) およびクレアチニン濃度を BUN-テスト-ワコー (和光純薬工業) およびクレアチニンアッセイキット (Cayman Chemical 社) を用いて計測した。血清中抗 dsDNA 抗体濃度の測定は市販の Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットを用いた (ALPHA DIAGNOSTIC INTERNATIONAL 社)。また、尿中のアルブミン濃度をレビス アルブミン-マウス ELISA キット (シバヤギ社) を用いて測定した。

7. Real-time Reverse transcription (RT) - polymerase chain reaction (PCR) 解析

第2章と同様の方法で、擬手術群および性腺摘出群の腎臓より total RNA を抽出後、cDNA に合成し、*Fcgr2b* および *Fcgr3* に対する Real-time PCR 解析を行った。解析には第2章と同様のプライマーを用いた (表 3-2)。生データはハウスキーピング遺伝子である *Actb* の値で補正した。*Fcgr2b* に対する *Fcgr3* の比率を補正した値から算出し、擬手術の雄に対する相対値で示した。

8. 統計処理

全てのデータは各群の平均値±標準誤差 (Mean ± S.E.) で表した。検定は全てノンパラメトリック法 (Mann-Whitney *U* 検定) で行い、いずれも 5% 以下を有意な差とした。

成 績

体重、血清中ホルモン濃度および腎重量

マウスの体重について、雄の性腺摘出群は擬手術群よりも緩慢な増加傾向を示した。一方、雌の両群に明らかな差は認められなかった（図 3-1a）。血清中テストステロン濃度について、雌雄共に性腺摘出群で低く、とくに雄で有意差が認められた（図 3-1b）。血清中エストロゲン濃度について、雄で性腺摘出の影響は認められなかったが、雌で性腺摘出群が有意に低い値を示した（図 3-1c）。腎重量において雌雄共に性腺摘出群で低く、雄の性腺摘出群が擬手術群より有意に低い値を示した。（図 3-1d）。

性腺摘出による腎臓への影響

図 3-2a-d に雌雄の擬手術群および性腺摘出群における糸球体の PAS 染色像を示す。第 1 章の結果と同様に、擬手術群では雌の糸球体において雄よりも重篤な膜性病変および増殖性病変が観察された（図 3-2c）。雄の性腺摘出群は擬手術群よりも重篤な病態を示し（図 3-2a および b）、膜性病変よりもむしろメサンギウム基質および細胞の増加、単核細胞の浸潤による増殖性病変の増悪を呈していた（図 3-2b）。一方、雌群の性腺摘出群において糸球体病変の軽減している個体が認められたが、個体差が大きく、一定した傾向は得られなかった（図 3-2c および d）。

増殖性病変の指標として糸球体の核数を計測したところ、雄の性腺摘出群および雌の擬手術群が雄の擬手術群よりも有意に高値を示した（図 3-2e）。糸球体腫大の指標として腎小体の直径を計測したところ、雄の性腺摘出群および雌の擬手術群が雄の擬手術群よ

りも有意に高値を示した（図 3-2f）。雌の性腺摘出群では両計測値が減少する傾向にあったが、統計学的な有意差は認められなかった。

IgG2b 免疫染色によって、免疫複合体沈着の程度を評価した。IgG2b 陽性反応は主に糸球体基底膜に観察された（図 3-3a-d）。IgG2b 陽性糸球体率を算出したところ、雄の性腺摘出群および雌の擬手術群が雄の擬手術群よりも有意に高値を示した（図 3-3e）。雌の性腺摘出群に変化は認められなかった。

CD3 および B220 免疫染色において、雌の擬手術群および雄の性腺摘出群で、CD3 陽性細胞が糸球体に浸潤している像が認められたが（図 3-4a-d）、B220 陽性細胞の浸潤像は検出されなかった（図 3-4e-h）。CD3 陽性糸球体率は、擬手術群では雌が雄よりも有意に高い値を示し（図 3-4i）、性腺摘出群では雄が値の増加を、雌が値の減少を示した。

腎機能評価のため、尿中のアルブミン濃度および血中の尿素窒素濃度を計測した（表 3-1）。尿中のアルブミン濃度では、雄の性腺摘出群が擬手術群よりも有意に高い値を示した。一方、雌では性腺摘出による有意な影響は認められなかった。血中の尿素窒素濃度では、雌雄共に群間の有意差は認められなかった。

性腺摘出による免疫器官への影響

脾臓重量では、雄の性腺摘出群および雌の擬手術群はほぼ同等に雄の擬手術群よりも有意に高値を示した（図 3-5a）。一方、雌群では、性腺摘出によって値が減少する傾向にあったが、有意差は認められなかった。胸腺重量の雌雄差および性腺摘出による影響は微弱で、雄の性腺摘出群が擬手術群よりやや高値を示す傾向にあった（図 3-5b）。

脾臓において CD3 陽性細胞は動脈周囲リンパ組織鞘に、B220 陽性細胞は脾臓リンパ濾胞に認められたが、その局在に性腺摘出による影響は認められなかった（図 3-6a-h）。CD3 陽性面積を計測したところ、雄の性腺摘出群が擬手術群よりも有意に高値を示したが、

雌群では性腺摘出による影響は認められなかった（図 3-6i）。一方、B220 陽性面積では雌の擬手術群が他の群よりやや高値を示す傾向にあったが、有意な差は認められなかった（図 3-6j）。

胸腺において CD3 陽性細胞が認められ、その局在は群で異なっていた。すなわち、雄の擬手術群でそれは主に胸腺髄質の胸腺細胞に認められたが、残りの 3 群では胸腺髄質に加え、胸腺皮質の胸腺細胞にも散在性に陽性反応が認められた（図 3-7a-d）。

自己免疫疾患の病態の指標として、血中の総 IgG 濃度および抗 dsDNA 抗体濃度を計測した。これらは共に雌が雄よりも高値を示したが、雌雄共に性腺摘出による影響は認められなかった（図 3-8a および b）。

性腺摘出が *Fcgr* の発現に与える影響

腎臓における *Fcgr2b* の発現を定量的 real-time PCR 法で解析したところ、雌の擬手術群が最も高値を示し、雄の擬手術群および雌の性腺摘出群との間に有意差が認められた（図 3-9a）。*Fcgr3* においても、雌の擬手術群が最も高値を示し、雄の擬手術群よりも有意に高値を示した。また、雄では性腺摘出群が擬手術群よりも有意に高値を示した（図 3-9b）。*Fcgr3/Fcgr2b* 比を算出したところ、雌の擬手術群が雄の擬手術群よりも有意に高値を示した（図 3-9c）。また、雄では性腺摘出群が擬手術群よりも有意に高値を示した。一方、雌では性腺摘出による影響は認められなかった。

考 察

B6.MRLc1(82-100)コンジェニックマウスに性腺摘出術を施すことで、雄では血清中テストステロン濃度の、雌では血清中エストロゲン濃度の有意な減少が確認された。腎病理組織学的解析では、雄の性腺摘出群で増殖性病変の増悪がみられた。NZB/WF1マウスを用いた研究において、雄で性腺摘出により病態が悪化し、テストステロンの投与によって寛解することが報告されている (Roubinian et al., 1978; Yacoub Wasef, 2004; Zandman-Goddard et al., 2007)。また、男性のSLE患者ではアンドロゲン濃度の減少が認められる (Lahita and Bradlow, 1987; Yacoub Wasef, 2004; Zandman-Goddard, 2007)。これらの知見より、B6.MRLc1(82-100)マウスの腎臓では雄性ホルモンの減少が病態形成に促進的に働いていることが示唆された。複数の自己免疫疾患モデルマウスを用いた解析において、エストロゲンの作用により病態が悪化すること、性腺摘出で病態が軽減することが知られている (Grimaldi et al., 2005; Yacoub Wasef, 2004; Zandman-Goddard, 2007; Roubinian et al., 1978; Sthoeger et al., 2004)。しかしながら、雌のB6.MRLc1(82-100)マウスでは、性腺摘出によって糸球体病変の寛解がわずかに認められたものの、形態計測学的な有意差は認められなかった。すなわち、B6.MRLc1(82-100)マウスにおける糸球体病変の雌雄差形成には、雌性ホルモンよりも雄性ホルモンの方が深く関与していると考えられる。

腎臓の糸球体は性ホルモン受容体を発現し、細胞外マトリックスのターンオーバーに関与している (Potier et al., 2001; Elliot et al., 2007)。糸球体硬化症はメサンギウム基質の増加など、細胞外マトリックスの代謝異常による硬化性病変を主体とする病態であるが、テストステロンが病態形成に促進的に、エストロゲンが抑制的に働くことが知られている (Elliot et al., 2007)。しかしながら、これらの報告と

B6. MRLc1 (82-100) マウスの腎臓における性腺摘出の影響を関連付けることはできなかった。また、雄の性腺摘出群では糸球体への単核細胞浸潤が増悪していたことから、B6. MRLc1 (82-100) マウスの糸球体病変の雌雄差には、性ホルモンの糸球体への直接的な作用よりも炎症細胞への影響が深く関与すると考えられた。

性が免疫機構に大きな影響を与えることは周知の通りであり、女性は免疫応答能が高く、感染に対する防御能および自己免疫疾患に対する感受性などが男性よりも高い (Bouman et al., 2005)。本研究において、性腺摘出の免疫系への影響を胸腺および脾臓で評価したところ、両臓器重量は雌の方が重く、性腺摘出によって雄で両値が増加する傾向にあった。また、脾臓および胸腺における雌雄差および性腺摘出の影響は B 細胞より T 細胞に関連して認められた。すなわち、脾臓では雌が雄より広い T 細胞領域を示し、雄の T 細胞領域は性腺摘出により有意に拡大した。胸腺では、雄の擬手術群の CD3 陽性細胞は髄質に局限していたが、雌の擬手術群および雄の性腺摘出群では皮質にも散在性に認められた。ヒトにおいて男性の T 細胞数は女性よりも少ないこと、女性の Interleukin-2 (IL-2) 産生 T 細胞の比率は男性よりも高いことが知られている (Bouman et al., 2004)。マウスにおいてアンドロジェンの自己免疫疾患抑制作用は胸腺依存性であり、テストステロンは T 細胞増殖に抑制的に作用することが報告されている (Roubinian et al., 1977; McMurray et al., 2001)。さらに、性腺を摘出した C57BL/6 雄マウスの T 細胞は Th1 サイトカインである IL-2 や Interferon-gamma (IFN- γ) の産生能が高い (Viselli et al., 1995)。これらの報告は、T 細胞機能には明らかな雌雄差が存在し、とくにテストステロンが T 細胞の生存および機能に抑制的に作用することを示している。以上の知見より、性腺摘出を施した雄の B6. MRLc1 (82-100) マウスでは、アンドロジェンの作用低下による T 細胞の活性化が起きていると考えられる。雄の性腺摘出

群で糸球体に T 細胞浸潤が増悪していたが、これは Th1 サイトカインなどの局所炎症メディエーターの産生増加に起因するのかもしれない。

雄の性腺摘出群は擬手術群より顕著な尿中アルブミン排出を示した。尿へのアルブミン排出は糸球体病変の指標とされ、腎機能の悪化と共に増加する (Venkat, 2004; Aiba et al., 1991)。尿中への蛋白の排出には性差が存在し、雄は雌よりも多い (Sabolić et al., 2007)。すなわち、健常な動物では雄性ホルモンが尿中への蛋白排出に促進的に働くが、B6. MRLc1 (82-100) マウスでは雄性ホルモンの減少がアルブミンの排出に促進的に働く結果が示された。尿中アルブミン排出増加の直接的な原因は糸球体上皮細胞の足突起の退縮、スリット膜の再構築あるいは基底膜の破綻などにある (Akhtar and Al Mana, 2004)。興味深いことに、糸球体腎炎モデルマウスにおいて尿中アルブミンの排出時期に一致して糸球体への T 細胞浸潤が認められ、糸球体局所の T 細胞に制御される二次的な免疫反応が尿中蛋白排出に深く関連することが示唆されている (Meyer et al., 2007)。また、糸球体への T 細胞浸潤と共に糸球体上皮細胞が減少し、免疫複合体沈着領域付近の糸球体上皮細胞に足突起の癒合が認められることも報告されている (Meyer et al., 2007)。すなわち、B6. MRLc1 (82-100) マウスで認められた雄の性腺摘出によるアルブミン排出増加の一因は、糸球体への T 細胞浸潤や免疫複合体沈着の増加に関連する糸球体上皮細胞の障害にあると考えられる。今後、本モデルマウスにおける糸球体上皮細胞傷害の評価は、自己免疫性糸球体腎炎におけるアルブミン尿排出の増加機構を明らかにするうえで重要であろう。一方で、近位尿細管はネフロン中で最長の分節であり、アルブミンの吸収に最も重要な役割を果たしている (Venkat, 2004; Aiba et al., 1991; Exaire et al., 1972; Thomas et al., 1999; Sabolić et al., 2007)。テストステロンは近位尿細管上皮の発達に促進的に働き、性腺摘出は近位尿細管上皮の萎縮を引き起こす (Yabuki et al., 1999; Oudar et al., 1991; Blantz et al., 1988; Schiebler and Danner, 1978)。

それ故、雄の性腺摘出群で認められたアルブミン排出の増加は近位尿細管の萎縮による再吸収能の低下にも影響を受けているのかもしれない。

自己免疫疾患の患者あるいはモデル動物の血中にはヒストン、DNA および RNA などの核の構成成分に対する自己抗体が検出される。この自己抗体の産生も性ホルモンの影響を受けることが知られており、エストロジェンが増悪因子として、テストステロンが抑制因子として働く (Lahita and Bradlow, 1987; Ahmed et al., 1999)。B6.MRLc1(82-100)マウスでも、雌が雄よりも有意に高い抗 dsDNA 抗体濃度を示したが、雌雄共に性腺摘出の影響は認められなかった。すなわち、B6.MRLc1(82-100)マウスの自己抗体産生における雌雄差は性ホルモンの影響を受けないことが示唆された。この自己抗体の雌雄差に与える因子としては性染色体が考えられる。ヒトでは、膜性腎症患者における抗尿細管基底膜抗体の出現と X 染色体の連鎖が報告されている (Tay et al., 2000)。また、女性の X 染色体モノソミーであるターナー症候群において、自己抗体に起因する甲状腺炎の原因遺伝子は X 染色体 p11.2-p22.1 に存在する (Zinn et al., 1998)。一方、BXSB マウスの病態の雌雄差形成には X 染色体上の *Yaa* 遺伝子が関与し、その本態は single stranded RNA 受容体遺伝子 (*Tlr7*) の重複であることが明らかにされた (Pisitkun et al., 2006)。これらの報告はいずれも性染色体異常と自己免疫疾患の関連性を報告するものであるが、B6.MRLc1(82-100)マウスの性染色体は健常な C57BL/6 マウス型である。B6.MRLc1(82-100)マウスの *Mag* 遺伝子座と性染色体上の遺伝子との相互作用が自己抗体における雌雄差を決定している可能性も考えられるが、今後の詳細な検討が必要である。

Mag は免疫複合体受容体である $Fc\gamma$ 受容体遺伝子群を含む。第 2 章で抑制型および活性化型 $Fc\gamma$ 受容体バランスの変化が自己免疫性糸球体腎炎の一因となる可能性を示した。本章では、B6.MRLc1(82-100)マウスの *Fcgr* のバランスを性差および性腺摘出の影響を中心に評価し、雌の *Fcgr3* 高発現と高 *Fcgr2b/Fcgr3* 比、および雄の性腺摘出で両値の雌化

が認められた。健常女性における CD16 (Fc γ RIII) 陽性単球の比率は男性よりも高い (Ono et al., 2005)。SLE を発症した男性の末梢血単球および好中球の Fc γ RII 発現は健常な男性および SLE を発症した女性患者よりも低い (Chang et al., 1999)。一方、自己免疫疾患モデル動物において Fc γ 受容体の雌雄差に関連した報告はなく、今回の結果は *Fcgr* バランスの変化が自己免疫性糸球体腎炎の病態の性差を形成する一因となる可能性を示したものとして興味深い。一方で、*Mag* 以外の因子が自己免疫性糸球体腎炎の性差発現に関与していることも考えられる。MRL-*lpr* マウスおよび C57BL/6 マウスとの F2 を用いた Quantitative trait locus (QTL) 解析によって、C57BL/6 マウスの第 7 染色体には雄性に制御される糸球体腎炎ならびに脾腫抵抗性遺伝子座が存在する (Misu et al., 2007)。以上より、B6.MRLc1(82-100)マウスの病態の性差は、*Mag* あるいは C57BL/6 マウスのゲノム上に存在する病態関連遺伝子の影響も受けていると考えられる。

結論として、第 3 章では性腺摘出群を用いて B6.MRLc1(82-100)マウスの病態の性差を解析した。とくに、性腺摘出した雄で自己免疫性糸球体腎炎の病態が悪化していたため、B6.MRLc1(82-100)マウスの病態の雌雄差形成には雄性ホルモンの病態抑制作用が主に作用していることが示唆された。

小 括

自己免疫性糸球体腎炎モデルである MRL/MpJ マウス由来 B6. MRLc1 (82-100) コンジェニックマウスは雌が雄よりも重篤な糸球体腎炎を呈する。病態の性差発現の一因として性ホルモンの影響が考えられる。本章では、性腺を摘出した B6. MRLc1 (82-100) マウスを作成し、性ホルモンが糸球体腎炎の病態に与える影響を評価し、自己免疫性糸球体腎炎における性差について解析した。

1 ヶ月齢の B6. MRLc1 (82-100) マウスに手術を施して、性腺摘出群および擬手術群を（雌雄各 3 例）作出し、8 ヶ月齢で血清、尿および諸臓器を採取し、生化学的、組織学的ならびに分子生物学的手法を用いて解析した。

擬手術群における雌雄差は糸球体傷害値、IgG および CD3 陽性糸球体率、脾臓重量、血清中総 IgG 濃度および血清中自己抗体濃度で認められ、いずれも雌が雄よりも高値を示した。性腺摘出による影響は糸球体傷害値、IgG および CD3 陽性糸球体率、尿中アルブミン濃度、脾重量、脾臓における CD3 陽性面積において認められ、いずれも雄の性腺摘出群が擬手術群よりも高値を示した。興味深いことに、胸腺において CD3 陽性細胞は雄の擬手術群を除く全群で皮質および髄質の両方に観察された。第 2 章において、B6. MRLc1 (82-100) マウスの糸球体腎炎発症の一因として報告してきた腎臓の *Fcgr3/Fcgr2b* バランスを定量的 real-time PCR 法で解析したところ、擬手術群では雌が雄よりも有意に高値を示し、さらに、雄の性腺摘出群が擬手術群よりも有意に高値を示した。

以上の結果より、B6. MRLc1 (82-100) マウスの自己免疫性糸球体腎炎の病態の雌雄差は、雌性ホルモンよりも雄性ホルモンの病態抑制作用の影響を強く受けることが示唆された。

図および表

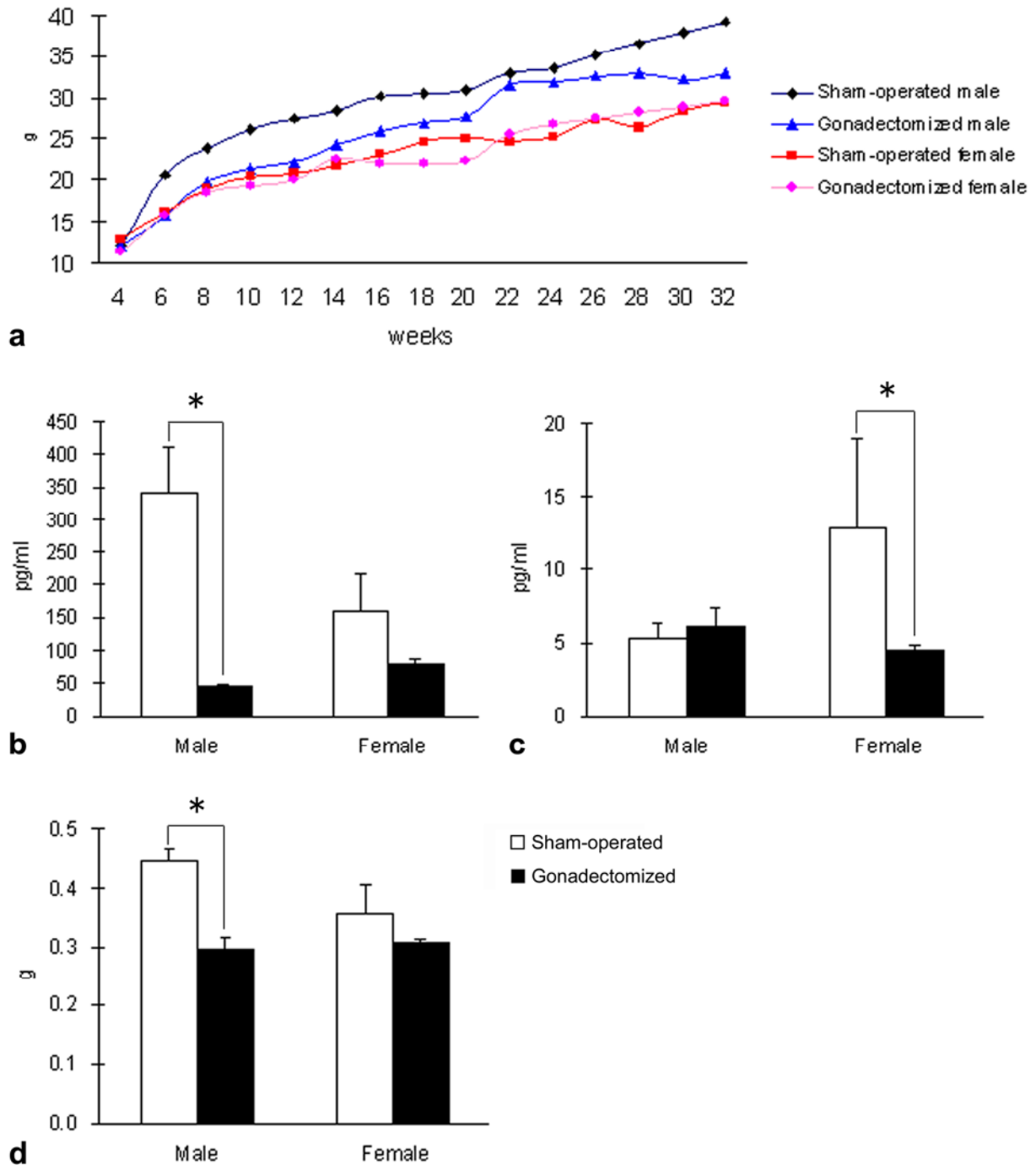


Fig. 3-1. Body weights, serum levels of sex hormones, and kidney weights. (a) Body weights recorded along a time course. Male sham-operated group (SG) mice (◆), male gonadectomized group (GG) mice (▲), female SG mice (■), female GG mice (●). Each value represents the mean $\pm$ SEM. (b) Serum concentrations of testosterone. (c) Serum concentrations of estradiol. (d) Total kidney weights. Each value represents the mean $\pm$ SEM. *: Significantly different from the values recorded for the SG mice of the same sex. $n = 3$. Statistical analysis: Mann-Whitney U test ($p < 0.05$).

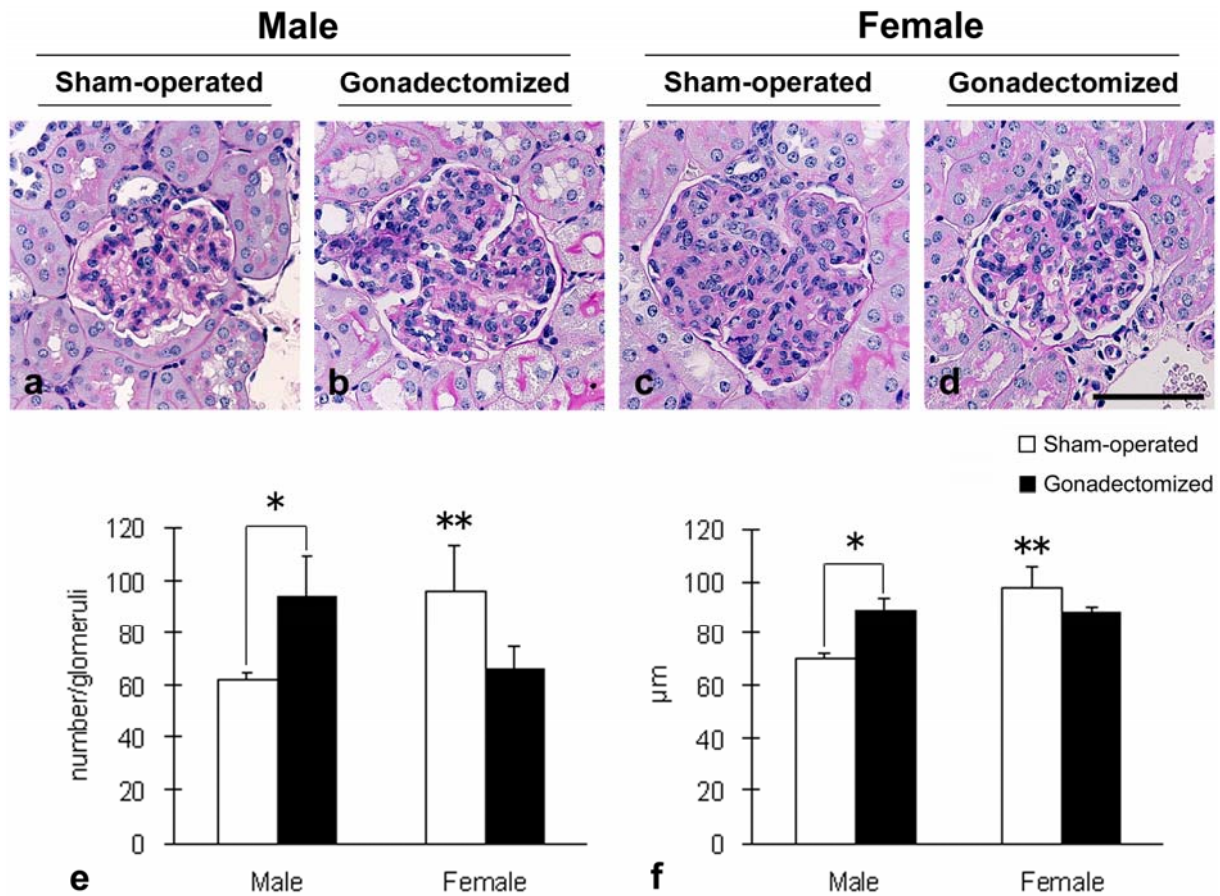


Fig. 3-2. Comparison of glomerular damage between the SG group and the GG group. (a-d) Light micrographs of the glomeruli. Male SG mice (a), male GG mice (b), female SG mice (c), female GG mice (d). In the SG, glomerular damage is more severe among the females than among the males (panels a and c). The glomeruli of female SG mice exhibit severe proliferative and membranous lesions (panel c). Among the males, those of the GG exhibit more severe proliferative lesions (rather than membranous lesions) than those of the SG. The proliferative lesions are characterized by expansion of the mesangial matrix, proliferation of the mesangial cells, and infiltration of mononuclear cells (panels a and b). Among the females, glomerular damage was ameliorated in some of the GG mice (panel d). Scale bar, 50 μm . (e) Number of nuclei in the glomeruli. (f) Diameter of the renal corpuscles. Each value represents the mean $\pm$ SEM. *: Significantly different from the values recorded for the SG mice of the same sex. **: Significantly different from the values recorded for the male SG mice. $n = 3$. Statistical analysis: Mann-Whitney U test ($p < 0.05$).

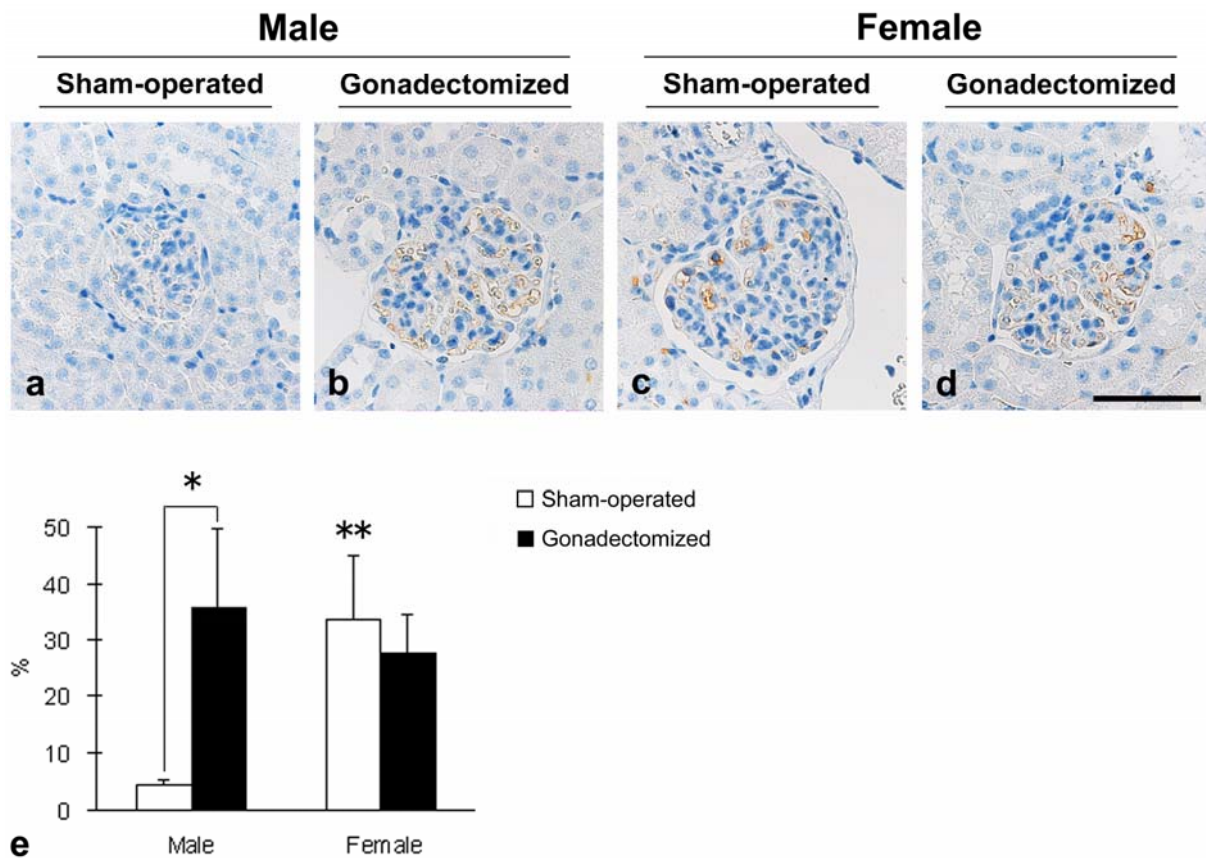


Fig. 3-3. Comparison of the SG group and the GG group with regard to immune-complex deposition in the glomeruli. (a-d) Immunohistochemical staining for IgG2b. Male SG mice (a), male GG mice (b), female SG mice (c), female GG mice (d). IgG2b immunoreactions are clearly observed in the glomerular basement membranes of the male GG, female SG, and female GG mice (panels b-d). However, this staining is minimal in the tissue samples of the male SG mice (panel a). Scale bar, 50 μ m. (e) Number of IgG2b-positive glomeruli. Each value represents the mean $\pm$ SEM. *: Significantly different from the values recorded for the SG mice of the same sex. **: Significantly different from the values recorded for the male SG mice. n = 3. Statistical analysis: Mann-Whitney *U* test ($p < 0.05$).

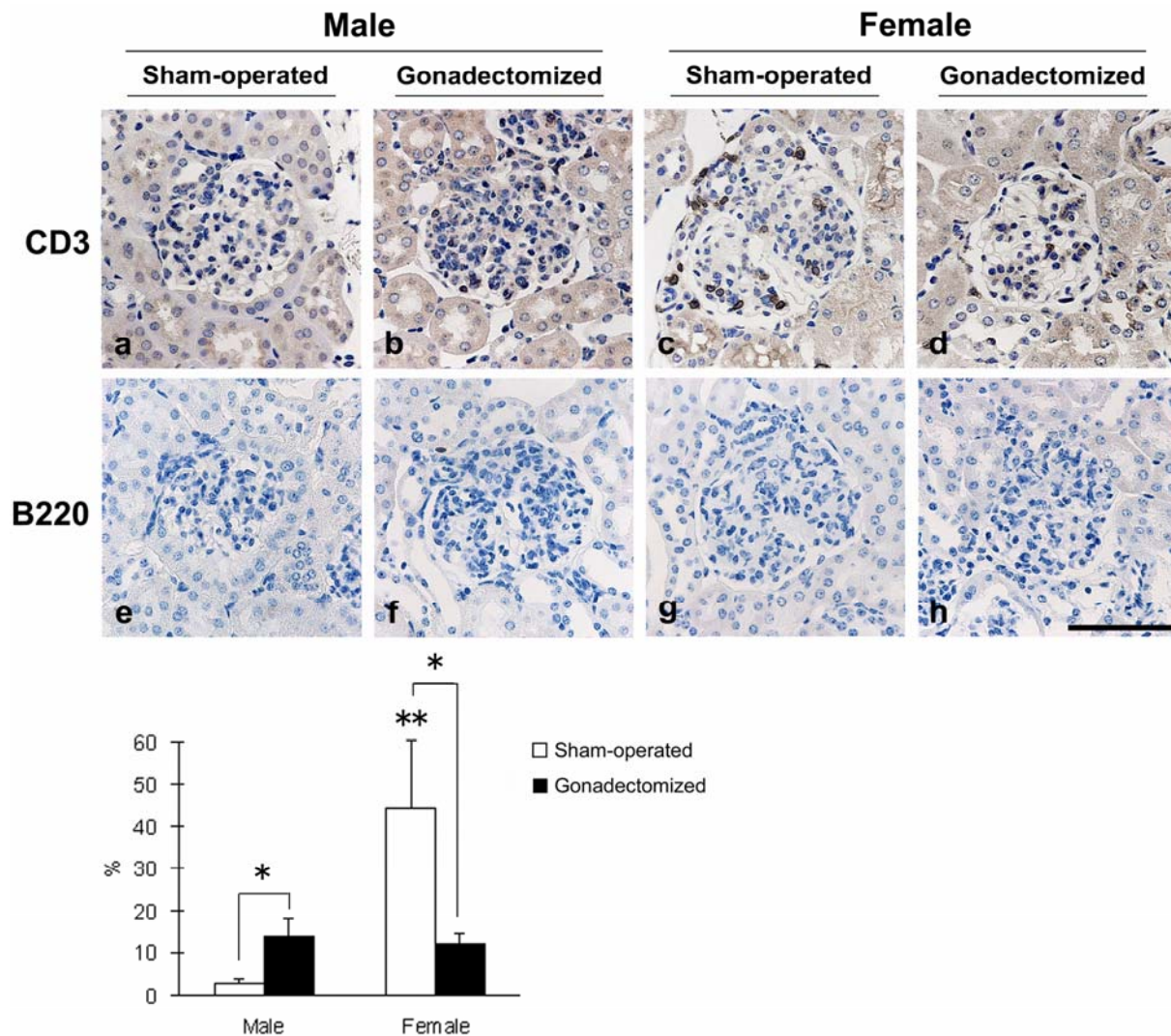


Fig. 3-4. Comparison of the SG and GG groups with regard to lymphocyte infiltration into the glomeruli. (a-d) Immunohistochemical staining for CD3. (e-h) Immunohistochemical staining for B220. Male SG mice (a and e), male GG mice (b and f), female SG mice (c and g), female GG mice (d and h). Infiltration of CD3-positive mononuclear cells is observed in the glomeruli of the male GG, female SG, and female GG mice (panels b-d). However, this infiltration is minimal in the case of the male SG mice (panel a). Infiltration of B220-positive mononuclear cells is not observed in the glomeruli of any of the mice. Instead, B220-positive cells are observed in the capillary lumen of interstitium (arrow). Scale bar, 50 μ m. (e) Number of CD3-positive glomeruli. Each value represents the mean $\pm$ SEM. *: Significantly different from the values recorded for the SG mice of the same sex. **: Significantly different from the values recorded for the male SG mice. $n = 3$. Statistical analysis: Mann-Whitney U test ($p < 0.05$).

Table 3-1. Summary of clinical parameters in B6.MRLc1(82-100) mice aged 8 months.

Parameters	Male		Female	
	<u>Sham-operated</u>	<u>Gonadectomized</u>	<u>Sham-operated</u>	<u>Gonadectomized</u>
Albuminuria (mg/dl)	2.26 $\pm$ 0.39	4.83 $\pm$ 1.12*	1.89 $\pm$ 0.54	2.55 $\pm$ 0.31
Blood Urea Nitrogen (mg/dl)	26.87 $\pm$ 1.36	27.71 $\pm$ 1.99	29.62 $\pm$ 2.91	41.45 $\pm$ 8.55

Each value represents the mean $\pm$ SEM. *: Significantly different from the values recorded for animals of the same sex in the sham-operated group. n = 3. Statistical analysis: Mann-Whitney *U* test ($p < 0.05$). The normal values (female C57BL/6 mice; age, 6 months) of albuminuria and blood urea nitrogen are 0.48 mg/dl and 16.94 mg/dl, respectively.

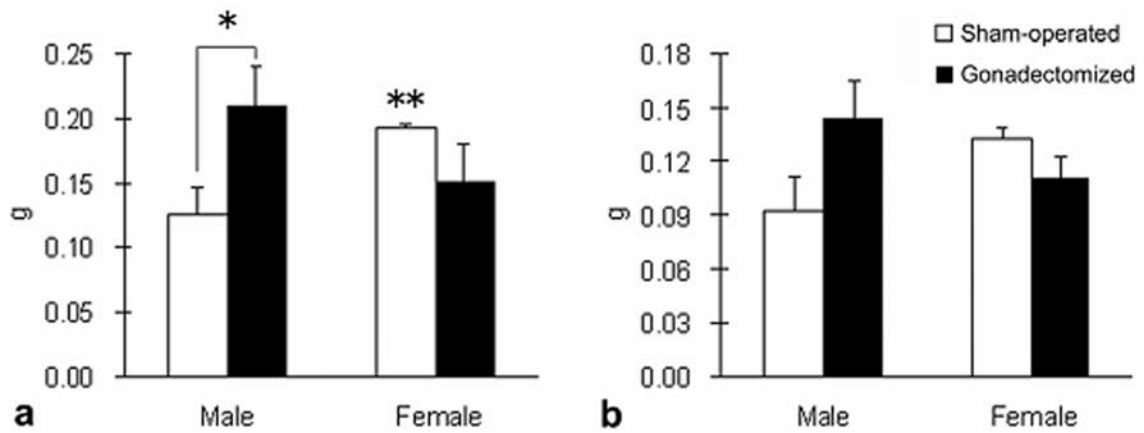


Fig. 3-5. Weights of the immune organs. (a) Spleen weights. (b) Thymus weights. Each value represents the mean $\pm$ SEM. *: Significantly different from the values recorded for the SG mice of the same sex. **: Significantly different from the values recorded for the male SG mice. $n = 3$. Statistical analysis: Mann-Whitney U test ($p < 0.05$).

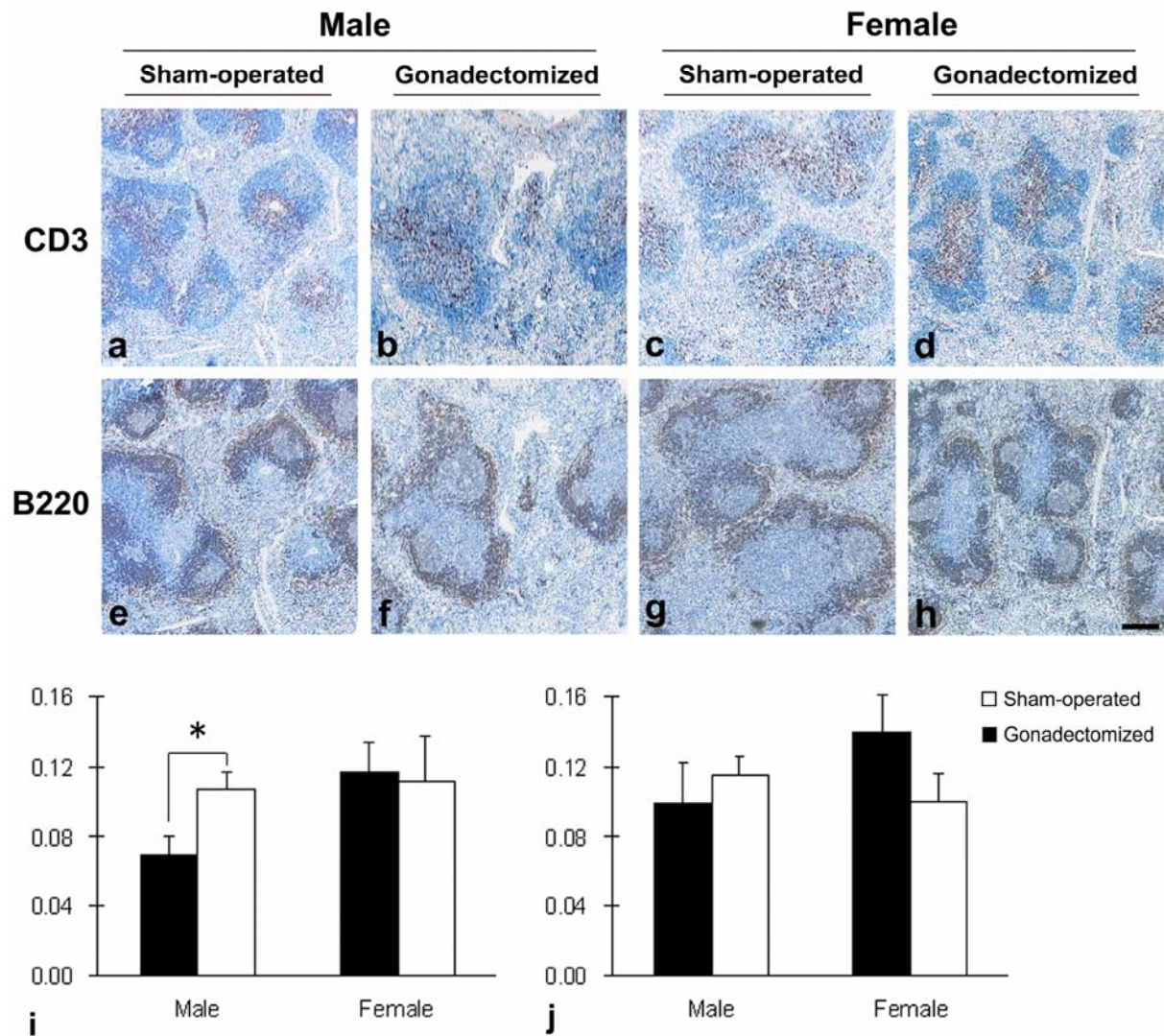


Fig. 3-6. Comparison of the areas of T and B cells in the spleen. (a-d) Immunohistochemical staining for CD3. (e-h) Immunohistochemical staining for B220. CD3- and B220-positive areas are mainly observed in the periarteriolar lymphatic sheath and splenic lymphoid follicles, respectively, and these findings do not differ between the groups. Scale bar, 200 μ m. (i) Histoplanimetric analysis for CD3-positive areas in the spleen. (j) Histoplanimetric analysis for B220-positive areas in the spleen. Each value represents the mean $\pm$ SEM. *: Significantly different from the values recorded for the SG mice of the same sex. $n = 3$. Statistical analysis: Mann-Whitney U test ($p < 0.05$).

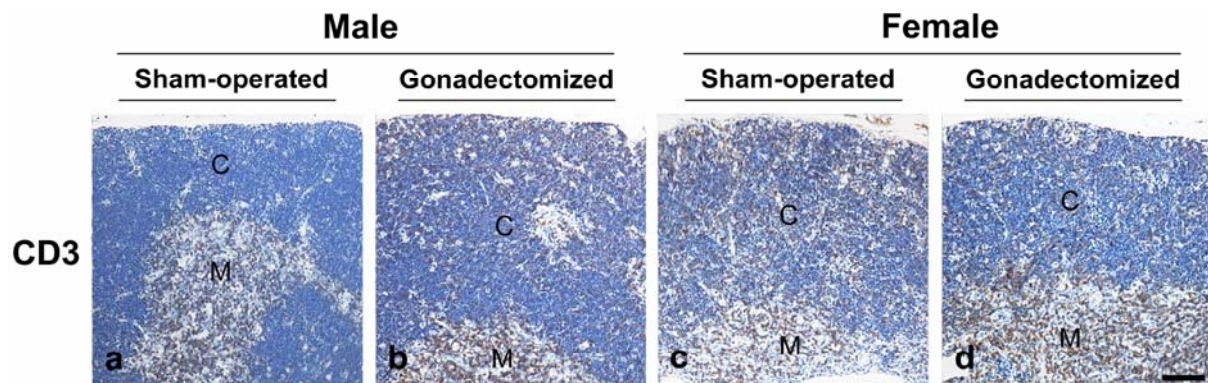


Fig. 3-7. Localization of T cells in the thymus. (a-d) Immunohistochemical staining for CD3. CD3-positive cells are mainly observed in the thymic medulla in all the mice (panels a-d). However, except in the case of the male SG mice (panel a), these cells are also diffusely localized in the thymic cortex of the mice (panels b-d). Scale bar, 200 μ m. C: cortex. M: medulla.

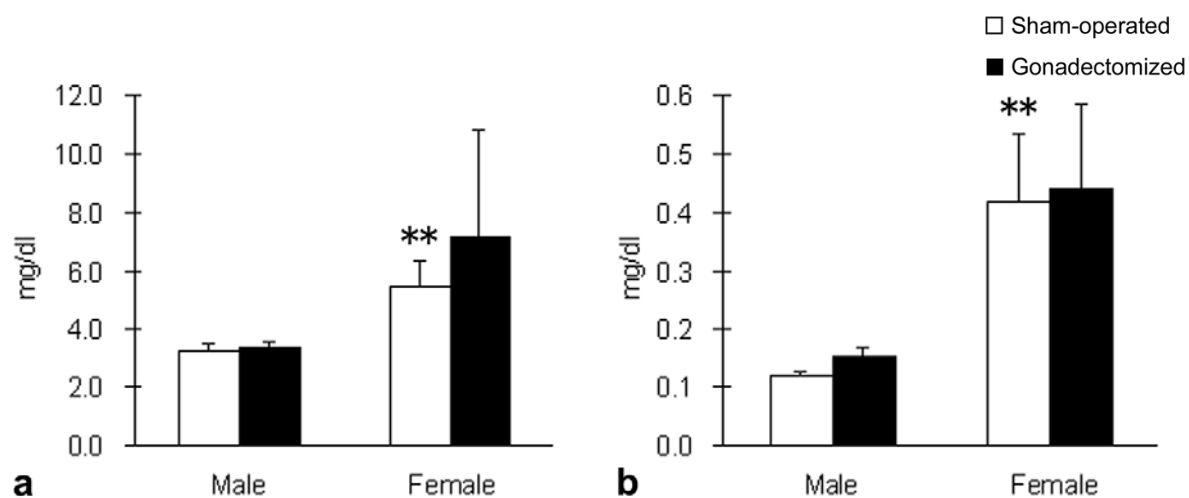


Fig. 3-8. Comparison of the serum levels of antibodies. (a) Total IgG. (b) Anti-dsDNA antibodies. Each value represents the mean $\pm$ SEM. **: Significantly different from the values recorded for the male SG mice. $n = 3$. Statistical analysis: Mann-Whitney U test ($p < 0.05$). Gonadectomy did not affect these parameters in any of the sexes.

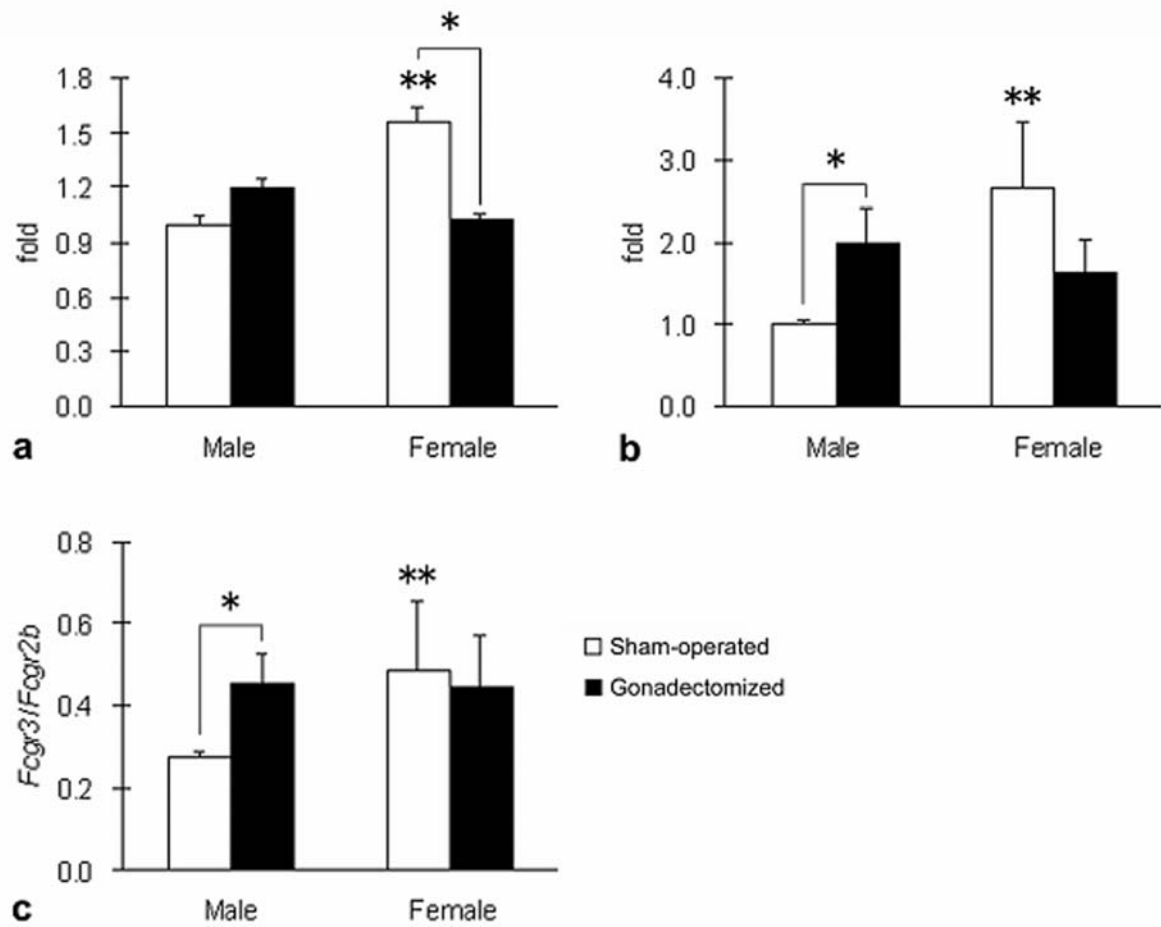


Fig. 3-9. Comparison of the relative expression levels of *Fcgr2b* and *Fcgr3* mRNA in the kidney, as determined by quantitative real-time PCR analysis. (a) *Fcgr2b*, (b) *Fcgr3*, (c) *Fcgr3-Fcgr2b* ratio. The raw values obtained for *Fcgr2b* and *Fcgr3* are normalized to those obtained for *Actb*, and the values are expressed as fold increases from the values recorded for the male SG mice. Each value represents the mean $\pm$ SEM. *: Significantly different from the values recorded for the SG mice of the same sex. **: Significantly different from the values recorded for the male SG mice. $n = 3$. Statistical analysis: Mann-Whitney U test ($p < 0.05$).

Table 3-2 Summary of gene-specific primer pairs.

Genes (Accession No.)		Primer Sequence (Primer Position)		Product Size
<i>Fcgr2b</i> (NM_001077189.1)	Forward	5' -CTGAGGCTGAGAATACGATC-3' (1000-1019)		307 bp
	Reverse	5' -GTGGATCGATAGCAGAAGAG-3' (1287-1306)		
<i>Fcgr3</i> (NM_010188.4)	Forward	5' -ATCACTGTCCAAGATCCAGC-3' (652-671)		346 bp
	Reverse	5' -GCCTTGAAGTGGTGATCCTA-3' (978-997)		
<i>Actb</i> (NM_007393)	Forward	5' -TGTTACCAACTGGGACGACA-3' (304-323)		165 bp
	Reverse	5' -GGGGTGTGAAGGTCTCAAA-3' (449-468)		

第 4 章

自己免疫性糸球体腎炎増悪因子の同定

緒 言

代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) は皮膚病変、リンパ節の腫大、自己抗体の出現、漿膜炎および糸球体腎炎など、免疫機構の破綻によって全身臓器が多彩な病態を呈する。各々の病態には、全身の自己免疫反応を制御する因子に加えて、局所における病態増悪因子が複雑に関与している。それ故、各臓器の病勢を制御していくためには、病態ごとの原因因子および増悪因子の同定が不可欠である。近年、これらの因子の同定に、自己免疫疾患患者の体液や生検材料をサンプルとしたマイクロアレイによる網羅的解析が行われるようになり、補体、細胞接着因子、抗原提示関連因子、炎症性サイトカイン、ケモカインおよびそれらの受容体などをコードする遺伝子の発現に変化の起きていることが報告されている (Nikpour et al., 2007; Han et al., 2003; Qing et al., 2004; Ishii et al., 2005; Nzeusseu Toukap et al., 2007)。マイクロアレイ解析は非常に有用な手法であるが、選抜される遺伝子は膨大な数となる。また、患者の遺伝学的背景や病態の二次的変化を考慮した場合、遺伝子発現の変化と病態形成の関連性を考察することは非常に難しい。自己免疫疾患自然発症モデル動物においてもマイクロアレイ解析は行われているが、上述のような二次的影響を考慮し、コンジェニックマウスや臓器局所からの材料をアレイ解析に用いている。Haywood らは、自己免疫疾患モデルマウスである BXSB 系統由来のコンジェニックマウス用いてマイクロアレイ解析を行っている (Haywood et al., 2006)。また、Teramoto らは、MRL-Fas^{lpr} (MRL-*lpr*) マウスおよび MRL/MpJ マウスの糸球体をレーザーマイクロダイセクション法で収集し、両者の間でマイクロアレイ解析を行い、MRL-*lpr* の糸球体においてとくにケモカインおよびそれらの受容体遺伝子のアップレギュレーションが起きていることを報告している (Teramoto et al., 2008)。

第1章では、自己免疫疾患モデルである MRL/MpJ マウス由来 B6.MRLc1 (82-100) マウスを作出し、本マウスにおける自己免疫性糸球体腎炎の発症を確認した。また、第2章では遺伝子座置換領域 (MRL autoimmune glomerulonephritis: *Mag*) に包含されている活性化型 Fc γ 受容体遺伝子 (Fc receptor IgG low affinity III: *Fcgr3*) と抑制型 Fc γ 受容体遺伝子 (*Fcgr2b*) バランスの変化が自己免疫性糸球体腎炎の一因となる可能性を示した。*Mag* に糸球体腎炎原因遺伝子が存在することは明らかであるが、*Mag* 上の遺伝子が他の遺伝子発現に影響を与えることで、糸球体腎炎の病理発生に関与している可能性も考えられる。事実、培養細胞を用いた実験で、メサングウム細胞における *Fcgr3* および *Fcgr2b* の発現バランスの変化は Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) あるいは Regulated upon activation normal T expressed and presumably secreted (RANTES) などの炎症性メディエーターをコードする遺伝子の発現に影響を与えることが報告されている (Radeke et al., 2002)。B6.MRLc1 (82-100) マウスの腎病変は糸球体傷害を主体とし、野生型の MRL マウスに認められる血管周囲性細胞浸潤のような他の病理学的変化は少ない。また、コンジェニックマウスであるため、他の自然発症モデル動物のように染色体上に散在する自己免疫疾患感受性遺伝子の影響が少なく、B6.MRLc1 (82-100) マウスは自己免疫性糸球体腎炎の増悪因子の解析に非常に有用であると考えられる。

近年、炎症性サイトカインおよびケモカインは、関節リウマチおよび SLE などの炎症性疾患における創薬のターゲットとなっており、これらに対する抗体あるいは生理活性が競合する物質を患者に投与することによって治療効果が期待されている (Barksby et al., 2007; Segerer et al., 2000; Koch, 2005; Kytтарis et al., 2005)。それ故、疾患モデル動物における炎症反応の分子生物学的基礎を理解していく作業は、炎症性サイトカインやケモカインなど病態増悪因子の制御を目的とした治療をヒトあるいは動物の医療へ外挿していくために必須のステップである。そこで第4章では、腎臓内における

炎症性メディエーターの遺伝子発現、とくにサイトカイン、ケモカインおよびそれらの受容体の遺伝子に焦点を当てて、B6.MRLc1(82-100)マウスと C57BL/6 マウスの間で比較解析を行った。

材料および方法

本実験は、北海道大学の動物実験指針に従い、総長の承認を得て行われた（承認番号：8019）。

1. 動物

1-12 ヶ月齢の B6. MRLc1 (82-100) マウス、C57BL/6Cr Slc (C57BL/6) マウス（日本 SLC 社）および MRL/MpJ Jms Slc^{-lpr/lpr} (MRL-*lpr*) マウス（日本 SLC 社）を実験に用いた。マウスは第 1 章と同様の環境下で飼育した。マウスはペントバルビタール（40mg/kg、i. p.）の深麻酔下において総頸動脈を切断することで放血安楽死させ、腎臓、脾臓および胸腺を採取した。Total RNA 抽出用の組織は RNA later（Ambion 社）中に-30℃で保存した。蛋白抽出用の組織は-80℃で保存した。また、Laser Micro Dissection (LMD) 用の組織は、OCT コンパウンド（Tissue-tek: Sakura Finetek 社）に包埋後、イソペンタン（和光純薬工業）と液体窒素を用いて凍結させ、-80℃で保存した。残りの組織は 10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて 72 時間以上室温で浸漬固定し、各種組織学的解析に用いた。

2. PCR array 解析

RNA later 中に保存していた 12 ヶ月齢の C57BL/6 マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスの腎臓より、TRIzol reagent（Invitrogen 社）を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA を RNeasy Micro Kit（Qiagen 社）を用いて total RNA の精製を行った後、残存する DNA の分解のため Turbo DNase（Ambion 社）と 37℃で 30 分間反応させた。DNase 処理した total RNA を再度 RNA 精製した後、1.0 µg の total RNA と RT² PCR Array First Strand Kit（SuperArray 社）を用いて cDNA に合成した。合成した cDNA 溶液 10µl、

Inflammatory Cytokines and Receptors RT² Profiler™ PCR Arrays Type A Ver. 3 (SuperArray 社) および real-time サーマルサイクラー (MX 3000: Stratagene 社) を用いて 89 種類の炎症性サイトカイン、ケモカインおよびその受容体遺伝子の相対発現量について PCR array 解析を行った (表 4-1)。

3. Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (*Cxcl5*) および Interleukin 1 family member 6 (*Il1f6*) の発現解析

B6.MRLcl (82-100) マウスおよび C57BL/6 マウスの腎臓より抽出した total RNA を用いて *Cxcl5*、*Il1f6* および *Actb* の mRNA 発現解析を行った。抽出した total RNA を DNA 分解のため、DNase (ニッポンジーン社) と 37 °C で 15 分間反応させた。DNase 処理した total RNA を ReverTra Ace (東洋紡社) および oligo dT primer (Invitrogen 社) を用いて cDNA に合成した。PCR 反応は ExTaq (タカラ、東京) を用いて、初期変性 95 °C 5 分の後、熱変性 95 °C 40 秒、アニーリング 58 °C 30 秒、伸長反応 72 °C 30 秒の 3 ステップで 40 サイクル行った。マウス *Cxcl5*、*Il1f6* および *Actb* に対する特異的プライマーの詳細を表 4-2 に示した。増幅後のサンプルはエチジウムマイド含有 1% のアガロースゲル (Armasco 社) を用いて電気泳動し、紫外線ランプの下で写真撮影を行った。

合成した cDNA、RT-PCR と同様のプライマーおよび EXTaq を用いて、腎臓における *Cxcl5* および *Il1f6* の発現を半定量的に解析した (表 4-2)。*Cxcl5* および *Il1f6* に対する PCR 増幅は、初期変性 95 °C 5 分の後、熱変性 95 °C 40 秒、アニーリング 60 °C 30 秒、伸長反応 72 °C 40 秒を 32 サイクル後、72 °C 5 分を 1 サイクル行った。一方、*Actb* に対する PCR 増幅は、初期変性 95 °C 5 分の後、熱変性 95 °C 40 秒、アニーリング 60 °C 30 秒、伸長反応 72 °C 20 秒を 20 サイクル後、72 °C 5 分を 1 サイクル行った。増幅後のサンプルをエチジウムマイド含有 1% のアガロースゲル (Armasco 社) で電気泳動し、紫外

線ランプの下でデジタルカメラ DC290 (Kodak 社) を用いて写真撮影を行い、デジタル画像として保存した。これらの画像ファイルを用いてそれぞれの特異的バンドの pixel 数を Image J ver. 1.32j (NIH 社) で計測した。各サンプルの cDNA 濃度を *Actb* の発現量で補正し、*Cxcl5* および *Il1f6* の発現量を 1 ヶ月齢の雄の C57BL/6 マウスに対する相対値で示した。

4. *Cxcl5* の LMD/RT-PCR 解析

腎臓より、6 μ m 厚の新鮮凍結切片を作成し、poly-L-lysine (Sigma 社) コーティングした LMD 用フィルム (メイワフォーシス社) を張ったスライドガラスに貼り付け、風乾した。次いで、4°C の 100% AL : 酢酸 (19 : 1) で 4 分間固定した後、RNase-free H₂O (Gibco 社) で洗浄した。切片を 1% トルイジンブルーで 10 秒間染色後、RNase-free H₂O で洗浄し、風乾した。LMD は Ls-Pro300 (メイワフォーシス社) で行い、1 個体あたり 5 個の糸球体を回収した (図 4-1)。total RNA の抽出は RNAqueous (Ambion 社) で行い、残存する DNA 分解のため Turbo DNase (Ambion 社) と 37 °C で 30 分間反応させた。次いで、ReverTra Ace (東洋紡社) および Random Hexamer (Gibco BRL 社) を用いて cDNA に合成した。特異的バンドの検出は nested PCR で行った。すなわち、1st PCR 反応は Promega Taq (Promega 社) を用いて、初期変性 95 °C 5 分の後、熱変性 95°C 40 秒、アニーリング 60 °C 30 秒、伸長反応 72 °C 30 秒の 3 ステップで 40 サイクルの反応を行った。2nd PCR 反応は、1st PCR の反応液 1 μ l および内部配列特異的プライマー (表 4-2) を用いて、1st PCR と同じ条件で行った。増幅後のサンプルはエチジウムマイド含有 1% のアガロースゲル (Armasco 社) を用いて電気泳動し、紫外線ランプの下で写真撮影を行った。

5. IL-1F6 のウェスタンブロッティング解析

採取した腎臓 1 g に対し 1 ml の Modified RIPA Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton X-100、0.1% SDS、1% sodium deoxycholate、1 mM PMSF、10 μ l protease inhibitor cocktail (Sigma 社)) を加えてホモジナイズした後、4°C 10,000 g 2 分間の遠心によって可溶化蛋白を抽出した。抽出液に 4 X SDS サンプル緩衝液 (200 mM Tris-HCl pH 6.8、40% glycerol、8% SDS、0.04% bromophenol blue、24% 2-mercaptoethanol) を加えて 100°C 3 分間加熱し、12.5% ポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL: アトー社) で電気泳動を行った。泳動後の蛋白を PVDF 膜 (アトー社) に 20 mA/mm² の条件で転写し、1 X Chemiblocker (Millipore 社) を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。TBS/0.1% Tween 20 で洗浄後、1000 倍希釈した未標識ヤギ抗マウス IL-1F6 抗体 (R&D Systems 社) と 4°C で一昼夜反応させた。TBS/0.1% Tween 20 で洗浄後、20000 倍希釈した HRP 標識ウサギ抗ヤギ IgG (Santa Cruz 社) と室温で 1 時間反応させ、Immobilon Western Detection Reagent (Millipore 社) を用いて免疫反応物の検出を行った。陽性対照には MRL-*lpr* マウスの腎臓を用いた。

6. *Il1f6* に対する *in situ* hybridization

Il1f6 の特異的プライマー (表 4-2) および B6.MRLc1 (82-100) マウスの腎臓由来の cDNA を用いて *Il1f6* の内部配列を増幅後 (534 bp)、1% アガロースゲル (Armasco 社) で電気泳動し、紫外線ランプの下で *Il1f6* の特異的バンドを切り出した。ゲル中の cDNA を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社) を用いて精製した。精製した cDNA を pGEM-T Easy vector (Promega 社) にライゲーション後、大腸菌 DH5 α (タカラ、東京) に遺伝子導入した。負の向きのインサートを有するクローンを選抜後、大腸菌よりプラスミドを抽出し、*Nde*I (タカラ社) で SP6 プロモーター側を、あるいは *Nco*I (タカラ社) で T7 プロモーター側を切断したプラスミドを作出し、フェノール-クロロホルム処理を

行い精製した。SP6 プロモーターを利用してセンス鎖を、T7 プロモーターを利用してアンチセンス鎖をジゴキシゲニン (DIG) RNA Labeling Kit (Roche Diagnostics 社) によってラベル合成した。

上述のように作製した DIG 標識プローブおよび 10 % 中性緩衝ホルマリンで固定した組織より作製した 4 μ m 厚の切片を用いて *in situ* hybridization を行った。すなわち、切片を脱パラフィン後、10 mg/ml のプロテイナーゼ-K で室温 1 時間処理した。切片を乾燥させた後、85°C で 10 分間熱処理した Hybridization buffer (50% 脱イオンホルムアミド、10mM Tris-HCl pH 7.6、10mg tRNA、1 X Denhardt' s 液、10% デキストラン硫酸、600mM NaCl、0.25% SDS、1mM EDTA pH8.0) で 2 時間の pre-hybridization を行った。次いで、DIG 標識プローブを含む Hybridization buffer (0.3 μ g/100 μ l) で 58°C 一昼夜の hybridization を行った。4 X SSC、2 X SSC、および 1 X SSC で段階的に洗浄後、2% blocking reagent (Roche Diagnostics 社) で室温 30 分間インキュベートした。2000 倍希釈のアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (Roche Diagnostics 社) と室温で 2 時間インキュベートした後、切片を洗浄し、BCIP/NBT 溶液 (Roche Diagnostics 社) で反応を検出した。Mayer のヘマトキシリンで核染色後、十分に風乾させ、キシレン封入剤で封入した。

7. CXCL5、IL-1F6、および Gr-1 に対する免疫組織化学

腎臓における CXCL5、IL-1F6 あるいは Gr-1 (好中球マーカー) 陽性細胞の検出にアビジン-ビオチン-コンプレックス (ABC) 法を用いた。一次抗体には 100 倍希釈の未標識ヤギ抗マウス CXCL5 抗体 (R & D Systems 社、MN、USA)、200 倍希釈の未標識ヤギ抗マウス IL-1F6 抗体 (R & D Systems 社、MN、USA)、および 800 倍希釈の未標識ラット抗マウス Gr-1 抗体 (R & D Systems 社、MN、USA) を用いた。一次抗体のインキュベーションを 4°C 一昼夜行い、二次抗体は CXCL5 および IL-1F6 検出用に 100 倍希釈したビオチン化ウサギ

抗ヤギ IgG 抗体 (Chemicon 社) を、Gr-1 検出用に 100 倍希釈のビオチン化ヤギ抗ラット IgG 抗体 (Cedarlane Laboratories 社) を用いた。ABC 溶液 (Vector laboratories 社) とのインキュベーション後、免疫組織化学的反応の検出を 3-3'-diaminobenzidine-0.003% (V/V) H_2O_2 溶液で行った。反応は蒸留水で停止後、Mayer のヘマトキシリンで核染色を行った。CXCL5 の抗原賦活化は脱パラフィン後に 0.01 M のクエン酸緩衝液で 105°C 20 分オートクレーブすることで行った。IL-1F6 については賦活化を行わなかった。Gr-1 の抗原賦活化は脱パラフィン後に 0.3% ペプシン/0.2 M 塩酸溶液と 37°C 15 分間反応させることで行った。

6-12 ヶ月齢マウスのホルマリン固定腎臓組織切片を用いて、腎臓における IL-1F6 陽性尿細管数の計測を行った。観察される全ての IL-1F6 陽性尿細管数を各月齢 3 個体以上計測した。また、免疫組織化学を行った切片に隣接する切片を用いて Periodic acid Schiff (PAS) 染色を施し、PAS 陽性尿円柱を有する尿細管の総数 (Proteinuria score) を計測した。

7. 統計処理

全てのデータは各群の平均値±標準誤差 (mean±S.E.) で表した。検定は全てノンパラメトリック法 (Mann-Whitney U 検定) で行い、いずれも 5%以下を有意な差とした。

成 績

糸球体腎炎増悪因子の選抜

12 ヶ月齢の B6. MRLc1 (82-100) マウスの雌雄間および雌の B6. MRLc1 (82-100) マウスと C57BL/6 マウスの間で、腎臓における 85 種のサイトカイン、ケモカインおよびその受容体遺伝子の発現を PCR array 法で比較解析した結果を表 4-3 に示す。表は両者の間で発現の差が大きく認められたものから上位 30 種類の遺伝子を示している。雌の B6. MRLc1 (82-100) マウスの腎臓において、*Cxcl1*、*Cxcl5*、chemokine (C-X-C motif) receptor 3 (*Cxcr3*)、chemokine (C-C motif) ligand 2 (*Ccl2*)、*Ccl3*、*Ccl4*、*Ccl6*、*Ccl7*、*Ccl8*、*Ccl11*、*Ccl12*、*Ccl17*、*Ccl20*、Chemokine (C-C motif) receptor 1 (*Ccr1*)、*Ccr3*、*Ccr5*、*Ccr7* および *Ccr8* などの、CC ケモカイン、CXC ケモカインおよびそれらの受容体遺伝子が顕著に高発現していた。とくに *Cxcl5* は雌の C57BL/6 マウスよりも 74 倍、雄の B6. MRLc1 (82-100) マウスよりも 58 倍高い値を示した。一方、B6. MRLc1 (82-100) マウスの雌雄間、あるいは雌の B6. MRLc1 (82-100) マウスと C57BL/6 マウスの間で、最も顕著な発現差が認められたのは *Il1f6* であり、雌の B6. MRLc1 (82-100) マウスは雌の C57BL/6 マウスよりも 186 倍、雄の B6. MRLc1 (82-100) マウスよりも 162 倍高い値を示した。

腎臓における *Cxcl5* および *Il1f6* mRNA の発現

12 ヶ月齢の雌雄の C57BL/6 マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスの腎臓における *Cxcl5*、*Il1f6* および *Actb* の発現を RT-PCR 法によって解析した結果を図 4-1 に示す。*Cxcl5* および *Il1f6* の発現は全ての動物で認められたが、両発現は雌、とくに B6. MRLc1 (82-100) マウスで強く認められた (図 4-1)。

腎臓における *Cxcl5* 発現の経時的変化とその局在

糸球体腎炎未発症期（1 ヶ月齢）、発症初期（6 ヶ月齢）および最盛期（12 ヶ月齢）の雌雄の C57BL/6 マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウス腎臓における *Cxcl5* 発現を半定量的 PCR 法で解析した（図 4-2）。全動物において、*Cxcl5* の相対発現量は月齢と共に増加する傾向にあった。両系統の雌において、6 ヶ月から 12 ヶ月にかけて値が顕著に増加していた。また、糸球体腎炎最盛期の 12 ヶ月齢において、雌の B6. MRLc1 (82-100) マウスが全群で最も高値を示した。

12 ヶ月齢雌マウスの糸球体における *Cxcl5* 発現を LMD/RT-PCR 法によって解析した。両系統ともに糸球体における *Cxcl5* の発現が確認されたが、B6. MRLc1 (82-100) マウスにおける *Cxcl5* の特異的バンドは C57BL/6 マウスよりも強く認められた（図 4-3）。

雌雄 12 ヶ月齢の B6. MRLc1 (82-100) マウス腎臓を用いて、*Cxcl5* のコード蛋白である CXCL5 に対する免疫組織化学を行った（図 4-4）。全ての群において、CXCL5 陽性反応は主として糸球体上皮細胞および間質に浸潤する単核細胞の細胞質に局在しており、とくに 12 ヶ月齢の雌 B6. MRLc1 (82-100) マウスで強く認められた（図 4-4b）。

雌雄の 12 ヶ月齢の B6. MRLc1 (82-100) マウスの腎臓を用いて、好中球マーカーである Gr-1 に対する免疫組織化学を行った（図 4-4c および d）。Gr-1 陽性反応は B6. MRLc1 (82-100) マウスの糸球体に浸潤する単核細胞に認められ、とくに糸球体傷害を顕著に示す雌の個体で強く認められた（図 4-4d）。

腎臓における *Il1f6* 発現の経時的変化とその局在

糸球体腎炎未発症期（1 ヶ月齢）、発症初期（6 ヶ月齢）および最盛期（12 ヶ月齢）の雌雄 C57BL/6 マウスおよび B6. MRLc1 (82-100) マウスの腎臓内 *Il1f6* 発現を半定量的 PCR 法で解析した（図 4-5）。値は雌の B6. MRLc1 (82-100) マウスで加齢性に増加する傾向が得ら

れ、とくに雌の B6. MRLc1 (82-100) マウスの値は高レベルで推移していた。

12 ヶ月齢の雌 B6. MRLc1 (82-100) マウス腎臓における *Il1f6* の局在を *in situ* hybridization 法によって解析した。*Il1f6* 陽性反応は尿細管、とくに拡張した尿細管上皮細胞の細胞質において強く認められた (図 4-6)。

マウスの腎臓を用いて、*Il1f6* のコード蛋白である IL-1F6 に対するウエスタンブロット解析および免疫組織化学を行った (図 4-7 および 8)。ウエスタンブロット解析では、B6. MRLc1 (82-100) マウスおよび陽性対照の MRL-*lpr* マウスにおいて、約 17kDa の IL-1F6 特異的バンドが認められた。一方、C57BL/6 マウスに IL-1F6 特異的バンドは認められなかった。免疫組織化学において、雄の B6. MRLc1 (82-100) で IL-1F6 陽性反応はほとんど検出されなかった (図 4-8a)。一方、月齢の進んだ雌の B6. MRLc1 (82-100) マウスでは、IL-1F6 陽性反応が遠位曲尿細管から集合管までの上皮細胞の細胞質および核に観察され (図 4-8b)、その反応は尿細管間質性病変の進行した個体で強かった (図 4-8c)。

6-12 ヶ月齢の雌の B6. MRLc1 (82-100) マウスの腎臓における IL-1F6 陽性尿細管数および同個体の連続切片における PAS 陽性尿円柱を有する尿細管の総数 (Proteinuria score: 図 4-9a) を計測した (図 4-9)。両値を計測した結果、個体差はあるものの IL-1F6 陽性尿細管数が多い個体ほど Proteinuria score でも高値を示す傾向にあり、両値の間に統計学的に有意な正の相関が得られた (図 4-9b)。

考 察

本章では、自己免疫性糸球体腎炎増悪因子の同定のために、炎症性サイトカイン、ケモカインおよびそれらの受容体遺伝子を標的とした PCR アレイ法による網羅的解析を行った。その結果、B6.MRLc1(82-100)マウスの腎臓では、とくに CC ケモカイン、CXC ケモカインおよびそれらの受容体遺伝子の高発現が認められた。これらのケモカインは分子内に保存されたシステイン残基をもち、この分子構造上の位置より CC、CXC、C および CX3C の 4 つのサブファミリーに分類されている (Koch, 2005; Segerer et al., 2000)。CC ケモカインは連続システイン残基の配列を、CXC ケモカインは二つのシステイン間に他のアミノ酸を組み込んだ配列を有している (Koch, 2005; Segerer et al., 2000)。前者は主としてリンパ球およびマクロファージ、後者は好中球の炎症組織への遊走性に関与する (Koch, 2005; Segerer et al., 2000)。MRL-*lpr* マウスの糸球体サンプルを用いたマイクロアレイ解析によって、ケモカインおよびケモカイン受容体遺伝子の高発現が、Th1 細胞、マクロファージおよび好中球の浸潤に関連する可能性が示されている (Teramoto et al., 2008)。前章では B6.MRLc1(82-100)マウスの糸球体における CD3 陽性細胞浸潤を明らかにし、さらに本章では糸球体における Gr-1 陽性好中球浸潤も明らかとなった。腎臓のメサンギウム細胞、内皮細胞および糸球体上皮細胞は、免疫複合体、リポ多糖 (LPS)、高濃度グルコース、薬物、アンギオテンシン II および尿中アルブミンなどによって刺激を受けると、ケモカインを含む炎症性メディエーターの産生を増加させ、糸球体へのリンパ球、多形核白血球およびマクロファージの浸潤を助長させる (Segerer et al., 2000)。また、メサンギウム細胞における *Fcgr3/Fcgr2b* バランスの変化は MCP1 (CCL2) および RANTES (CCL5) の発現を増加させる (Radeke et al., 2002)。これらの知見より、B6.MRLc1(82-100)マウスの腎臓における CC ケモカイン、CXC ケモカインおよびそれらの

受容体遺伝子の高発現は糸球体局所における炎症反応を介した病理発生に寄与していると考えられた。

B6.MRLc1(82-100)マウスの腎臓で高発現していたケモカイン遺伝子のうち、とくに *Cxcl5* の発現は C57BL/6 マウスの 57.75 倍と顕著に高かった。マウスの *Cxcl5* は CXCL5 (別名: Lipopolysaccharide induced CXC chemokine、Granulocyte chemotactic protein 2、Small inducible cytokine subfamily member 5、Epithelial neutrophil activating peptide-78) をコードしており、上皮細胞に発現する好中球遊走性ケモカインとして知られている (Koch, 2005; Segerer et al., 2000; Walz et al., 1997; Duchene et al., 2007)。ヒトの自己免疫疾患では関節リウマチと CXCL5 との関連性が示唆されている (Koch, 2005; Walz et al., 1997)。すなわち、CXCL5 はリウマチ患者の滑液中に豊富に存在するケモカインであり、マクロファージ、内皮細胞および繊維芽細胞が CXCL5 を産生している (Koch et al., 1994)。また、患者への抗 CXCL5 抗体投与により、滑液由来好中球の走化性が抑制されるとともに、腎皮質上皮由来株、肺動脈内皮細胞株、肺繊維芽細胞株および血中単球由来株で Interleukin-1 beta (IL-1 β) により CXCL5 発現が増加する (Walz et al., 1997)。本研究において、B6.MRLc1(82-100)マウスは加齢性に CXCL5 を強く発現し、それと一致して重篤な糸球体病変を呈した。これらの結果より、自己免疫性糸球体腎炎の病勢と *Cxcl5* mRNA 発現量の変化の間に正の相関が示唆された。本所見は CXCL5 と糸球体腎炎との関連性を示した初めての報告である。

CXCL5 は B6.MRLc1(82-100)マウスの糸球体上皮細胞に局在していた。糸球体上皮細胞は Fc receptor IgG alpha chain transporter (FcRn) を発現し、免疫複合体などの異物除去に参加する (Akilesh et al., 2008)。また、抗糸球体上皮細胞血清を投与した糸球体腎炎モデルマウスにおいて糸球体への T 細胞浸潤および蛋白尿の増加が認められるなど、糸球体上皮細胞は免疫機構を介した糸球体傷害に重要な役割を果たしていること

が示唆されている (Meyer et al., 2007)。糸球体上皮細胞に発現する CXCL5 の意義を明らかにした報告は無いが、肺、腸、膵臓あるいは滑膜に存在する上皮細胞およびマクロファージにおける CXCL5 発現の増加は、局所への炎症細胞の浸潤を助長する (Wals et al., 1997)。以上の知見より、糸球体上皮細胞は免疫複合体あるいは周囲の細胞から産生される炎症性メディエーターの刺激によって CXCL5 の発現を増強し、糸球体へ T リンパ球や好中球などの炎症細胞浸潤を誘導することで自己免疫性糸球腎炎の病理発生に関連していることが示唆された。

興味深いことに、雌の B6. MRLc1 (82-100) マウス腎臓において最も高発現していた遺伝子は、ケモカインおよびその受容体ではなく、*Il1f6* であった。*Il1f6* は Family of IL-1 (FIL1) としても知られ、IL-1 サイトカインファミリーの一員である (Barksby et al., 2007)。IL-1 サイトカインファミリーには IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra、IL-18、IL-1F5、IL-1F6、IL-1F7、IL-1F8、IL-1F9、IL-1F10 および IL-33 が存在し、サイトカイン、ケモカイン、一酸化窒素合成酵素 (NOS) およびマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) などの発現を誘導することで、免疫制御や炎症反応に重要な役割を果たしている (Barksby et al., 2007)。IL-1 ファミリーの中で、IL-1F5、IL-1F6、IL-1F7、IL-1F8、IL-1F9 および IL-1F10 は近年になって発見されたメンバーであり、IL-1F6 および IL-1F8 は IL-6 および IL-8 の産生を増加させることで炎症反応に促進的に、一方、IL-1F5、IL-1F7 および IL-1F10 はそれらの作用に抑制的に働くことが示唆されている (Towne et al., 2004; Barksby et al., 2007)。IL-1 ファミリーと自己免疫疾患の関連性は、IL-1 β とリウマチ性関節炎で多数報告されている (Barksby et al., 2007)。IL-1 β はリウマチ患者関節腔のマクロファージ、T 細胞、繊維芽細胞、および軟骨細胞で産生され、関節局所への白血球浸潤および MMP 誘導を介した組織の再構築に関与する (Westacott et al., 1990; Kay et al., 2004; Milner and Cawston, 2005; Graves and Cochran, 2003; Kornman et al., 1997;

Barksby et al., 2007)。IL-1F メンバーでは、IL-1F8 が滑膜繊維芽細胞および軟骨細胞の IL-6 および IL-8 の mRNA 発現レベルを増加させることで関節リウマチの病理発生に関与する (Magne et al., 2006; Barksby et al., 2007)。今回の研究で、雌の B6.MRLc1(82-100)マウス腎臓に IL-1F6 が加齢性に出現した事実は IL-1F6 と自己免疫性糸球体腎炎の関連性を示したものとして興味深く、B6.MRLc1(82-100)マウスにおける他の IL-1 ファミリー、IL-6 あるいは IL-8 の発現量の変化についても今後検討していく必要がある。

皮膚で IL-1F6 を強発現するトランスジェニックマウスは表皮の肥厚、真皮のマクロファージ浸潤、ランゲルハンス細胞数および T 細胞数の増加を示し、IL-1F6 が局所の炎症反応を介した組織傷害に関与することが示唆されている (Blumberg et al., 2007)。本研究において、IL-1F6 は雌 B6.MRLc1(82-100)マウスの遠位尿細管から集合管上皮細胞の細胞質あるいは核内に局在しており、とくに糸球体傷害末期に出現する尿細管間質性病変で強く観察された。さらに、B6.MRLc1(82-100)マウスにおいて IL-1F6 陽性尿細管と Proteinuria score の間に正の相関が認められた。近年、糸球体傷害によって漏出する原尿中のアルブミンは尿細管の傷害を引き起こすことが腎病理学者の注目を集めている。アルブミンの刺激を受けた遠位尿細管における Transforming growth factor beta (TGF- β) およびその受容体発現の増加は腎臓の線維化に関連することを示唆している (Liu et al., 2006)。また、糖尿病性腎症モデルラットおよび重篤な尿細管間質性病変を示す尿管結紮モデルマウスを用いた研究において、尿細管の拡張は遠位尿細管分画から始まり、間質の線維化に進行していくことが示唆されている (Obineche et al., 2001; Kida and Sato, 2007)。腎臓が傷害を受けた場合、遠位尿細管分画は成長因子である Epithelial growth factor (EGF) や Insulin-like growth factor (IGF) あるいは抗アポトーシス因子である B-cell leukemia/lymphoma 2 (BCL2) を産生し、腎臓の修復および

再生に関わっている可能性も示唆されている (Gobe and Johnson, 2007)。以上の知見より、高月齢の B6.MRLc1 (82-100) マウスの尿細管上皮細胞において認められた IL-1F6 の高発現は、オートクリンあるいはパラクリン様式で尿細管間質病変の病理発生あるいは傷害を受けた尿細管の再生に関与する可能性を有しており、尿細管間質性傷害の早期診断あるいは治療のターゲットとなりうる。

小 括

これまで著者は、MRL/MpJ 由来 B6. MRLc1 (82-100) コンジェニックマウスが自己免疫性糸球体腎炎モデルとして有用であることを報告してきた。本章では、腎臓における炎症性サイトカイン、ケモカインおよびそれらの受容体の遺伝子発現について B6. MRLc1 (82-100) マウスと C57BL/6 マウスの間で比較解析を行った。

12 ヶ月齢の B6. MRLc1 (82-100) マウスと C57BL/6 マウスの間で、腎臓における 89 種のサイトカイン、ケモカイン、およびその受容体遺伝子の相対発現量を PCR array 法によって解析した。B6. MRLc1 (82-100) マウスの腎臓において複数のケモカインリガンドおよびケモカイン受容体の遺伝子が顕著に高発現していた。とくに *Cxcl5* の相対発現量において、B6. MRLc1 (82-100) 雌マウスは C57BL/6 雌マウスよりも 74 倍、B6. MRLc1 (82-100) 雄マウスよりも 58 倍高い値を示した。雌の B6. MRLc1 (82-100) マウス腎臓における CXCL5 は糸球体上皮細胞に局在し、その発現量は加齢性に増加していた。

IL-1 ファミリーの一つである *Il1f6* は B6. MRLc1 (82-100) 雌マウスで最も顕著に高発現し、C57BL/6 雌マウスよりも 186 倍、B6. MRLc1 (82-100) 雄マウスよりも 162 倍高い値を示した。B6. MRLc1 (82-100) 雌マウスの腎臓における *Il1f6* 発現量は月齢と共に増加していた。*Il1f6* の遺伝子および蛋白の発現は遠位尿細管から集合管にかけて認められ、とくに B6. MRLc1 (82-100) 雌マウスの拡張した尿細管において強い発現が認められ、IL-1F6 陽性尿細管数と蛋白円柱を有する尿細管数の間に正の相関が認められた。

以上の所見より、B6. MRLc1 (82-100) マウスの腎臓で高発現する *Cxcl5* および *Il1f6* は糸球体局所および尿細管間質における腎病変の病理発生に深く関与していると考えられた。

図および表

Table 4-1. Gene table for PCRarray.

Number	RefSeq	Symbol	Description
1	NM_013854	<i>Abcf1</i>	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1
2	NM_009744	<i>Bcl6</i>	B-cell leukemia/lymphoma 6
3	NM_007551	<i>Blr1</i>	Burkitt lymphoma receptor 1
4	NM_009778	<i>C3</i>	Complement component 3
5	NM_009807	<i>Casp1</i>	Caspase 1
6	NM_011329	<i>Ccl1</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 1
7	NM_011330	<i>Ccl11</i>	Small chemokine (C-C motif) ligand 11
8	NM_011331	<i>Ccl12</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 12
9	NM_011332	<i>Ccl17</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 17
10	NM_011888	<i>Ccl19</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 19
11	NM_011333	<i>Ccl2</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 2
12	NM_016960	<i>Ccl20</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 20
13	NM_009137	<i>Ccl22</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 22
14	NM_019577	<i>Ccl24</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 24
15	NM_009138	<i>Ccl25</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 25
16	NM_011337	<i>Ccl3</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 3
17	NM_013652	<i>Ccl4</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 4
18	NM_013653	<i>Ccl5</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 5
19	NM_009139	<i>Ccl6</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 6
20	NM_013654	<i>Ccl7</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 7
21	NM_021443	<i>Ccl8</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 8
22	NM_011338	<i>Ccl9</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 9
23	NM_009912	<i>Ccr1</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 1
24	NM_009915	<i>Ccr2</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 2
25	NM_009914	<i>Ccr3</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 3
26	NM_009916	<i>Ccr4</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 4
27	NM_009917	<i>Ccr5</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 5
28	NM_009835	<i>Ccr6</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 6
29	NM_007719	<i>Ccr7</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 7
30	NM_007720	<i>Ccr8</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 8
31	NM_009913	<i>Ccr9</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 9
32	NM_007768	<i>Crp</i>	C-reactive protein, pentraxin-related
33	NM_009142	<i>Cx3cl1</i>	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
34	NM_008176	<i>Cxc11</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
35	NM_021274	<i>Cxc110</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
36	NM_019494	<i>Cxc111</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
37	NM_021704	<i>Cxc112</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
38	NM_018866	<i>Cxc113</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13
39	NM_011339	<i>Cxc115</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 15
40	NM_019932	<i>Cxc14</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 4
41	NM_009141	<i>Cxc15</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
42	NM_008599	<i>Cxc19</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
43	NM_009910	<i>Cxcr3</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
44	XM_894898	<i>Ccr10</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 10
45	NM_008337	<i>Ifng</i>	Interferon gamma
46	NM_010548	<i>Il10</i>	Interleukin 10
47	NM_008348	<i>Il10ra</i>	Interleukin 10 receptor, alpha
48	NM_008349	<i>Il10rb</i>	Interleukin 10 receptor, beta
49	NM_008350	<i>Il11</i>	Interleukin 11
50	NM_008355	<i>Il13</i>	Interleukin 13
51	NM_133990	<i>Il13ra1</i>	Interleukin 13 receptor, alpha 1
52	NM_008357	<i>Il15</i>	Interleukin 15
53	NM_010551	<i>Il16</i>	Interleukin 16
54	NM_019508	<i>Il17b</i>	Interleukin 17B
55	NM_008360	<i>Il18</i>	Interleukin 18
56	NM_010554	<i>Il1a</i>	Interleukin 1 alpha
57	NM_008361	<i>Il1b</i>	Interleukin 1 beta
58	NM_019450	<i>Il1f6</i>	Interleukin 1 family, member 6
59	XM_130058	<i>Il1f8</i>	Interleukin 1 family, member 8
60	NM_008362	<i>Il1r1</i>	Interleukin 1 receptor, type 1
61	NM_010555	<i>Il1r2</i>	Interleukin 1 receptor, type II
62	NM_021380	<i>Il20</i>	Interleukin 20
63	NM_008368	<i>Il2rb</i>	Interleukin 2 receptor, beta chain
64	NM_013563	<i>Il2rg</i>	Interleukin 2 receptor, gamma chain
65	NM_010556	<i>Il3</i>	Interleukin 3
66	NM_021283	<i>Il4</i>	Interleukin 4
67	NM_008370	<i>Il5ra</i>	Interleukin 5 receptor, alpha
68	NM_010559	<i>Il6ra</i>	Interleukin 6 receptor, alpha
69	NM_010560	<i>Il6st</i>	Interleukin 6 signal transducer
70	NM_009909	<i>Il8rb</i>	Interleukin 8 receptor, beta
71	NM_008401	<i>Itgam</i>	Integrin alpha M
72	NM_008404	<i>Itgb2</i>	Integrin beta 2
73	NM_010735	<i>Lta</i>	Lymphotoxin A
74	NM_008518	<i>Ltb</i>	Lymphotoxin B
75	NM_010798	<i>Mif</i>	Macrophage migration inhibitory factor
76	NM_007926	<i>Scyl1</i>	Small inducible cytokine subfamily E, member 1
77	NM_009263	<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein 1
78	NM_011577	<i>Tgfb1</i>	Transforming growth factor, beta 1
79	NM_013693	<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor
80	NM_011609	<i>Tnfrsf1a</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a
81	NM_011610	<i>Tnfrsf1b</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b
82	NM_011616	<i>Cd40lg</i>	CD40 ligand
83	NM_023764	<i>Tollip</i>	Toll interacting protein
84	NM_011798	<i>Xcr1</i>	Chemokine (C motif) receptor 1
85	NM_010368	<i>Gusb</i>	Glucuronidase, beta
86	NM_013556	<i>Hprt1</i>	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1
87	NM_008302	<i>Hsp90ab1</i>	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1
88	NM_008084	<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
89	NM_007393	<i>Actb</i>	Actin, beta, cytoplasmic

Table 4-2. Summary of gene-specific primer pairs.

Genes (Accession No.)		Primer Sequence (Primer Position)	Product Size	Application
<i>Cxc15</i> (NM_001.1)	Forward	5' - CATTTCGTGCTGTTTCAG -3' (221-240)	615bp	1st reaction for nested PCR, RT-PCR
	Reverse	5' - ACATATCCGGAGACAATGC -3' (816-835)		
	Forward	5' - CAGCATCTAGCTGAAGCTGC -3' (247-266)	438bp	2nd reaction for nested PCR
	Reverse	5' - TTGTGAGATGAGCAGGAAGC -3' (665-684)		
<i>Il1f6</i> (NM_009141.2)	Forward	5' - CTGCAGTCCCAAGGAAAGAG -3' (259-278)	534bp	Probe for in situ hybridization
	Reverse	5' - GCATCTGATTCAACCAAG -3' (773-792)		
	Forward	5' - GAGCAAACAGTTCCAGTCAC -3' (652-671)	408bp	RT-PCR
	Reverse	5' - ATCTTGAGAGAGTGCCACAG -3' (978-997)		
<i>Actb</i> (NM_007393)	Forward	5' - TGTACCAACTGGGACGACA -3' (304-323)	165bp	RT-PCR
	Reverse	5' - GGGGTGTTGAAGGTCTCAA -3' (449-468)		

Table 4-3. Results of PCRarray.

Number	RefSeq	Symbol	Female B6.MRLc1(82-100) / Female C57BL6	Symbol	FemaleB6.MRLc1(82-100) / Male B6.MRLc1(82-100)
1	NM_019450	<i>Il1f6</i>	185.85	<i>Il1f6</i>	162.24
2	NM_009141	<i>Cxcl5</i>	74.44	<i>Cxcl5</i>	57.76
3	NM_013654	<i>Ccl17</i>	29.41	<i>Ccl20</i>	37.58
4	NM_011333	<i>Ccl12</i>	26.14	<i>C3</i>	28.68
5	NM_021443	<i>Ccl18</i>	20.79	<i>Ccl17</i>	23.62
6	NM_010548	<i>Il10</i>	20.36	<i>Ccl18</i>	20.42
7	NM_016960	<i>Ccl20</i>	11.94	<i>Ccl12</i>	18.92
8	NM_011331	<i>Ccl12</i>	9.70	<i>Ccr5</i>	14.74
9	NM_008176	<i>Cxcl1</i>	9.11	<i>Il10</i>	12.23
10	NM_009914	<i>Ccr3</i>	8.74	<i>Ccr8</i>	11.98
11	NM_008599	<i>Cxcl9</i>	8.21	<i>Ccl2</i>	11.10
12	NM_013652	<i>Ccl14</i>	8.16	<i>Ccr1</i>	10.87
13	NM_013693	<i>Tnf</i>	7.82	<i>Ccl14</i>	10.43
14	NM_009917	<i>Ccr5</i>	7.51	<i>Ccl17</i>	9.08
15	NM_008337	<i>Ifng</i>	7.35	<i>Ccl11</i>	8.12
16	NM_011337	<i>Ccl3</i>	6.81	<i>Ccr3</i>	8.01
17	NM_009915	<i>Ccr2</i>	6.36	<i>Itgam</i>	7.85
18	NM_007719	<i>Ccr7</i>	6.27	<i>Il1b</i>	7.68
19	NM_013653	<i>Ccl15</i>	5.81	<i>Il1r2</i>	7.58
20	NM_008401	<i>Itgam</i>	5.73	<i>Ccl3</i>	6.33
21	NM_011338	<i>Ccl19</i>	5.46	<i>Cxcl1</i>	5.36
22	NM_021274	<i>Cxcl10</i>	5.20	<i>Il10ra</i>	5.21
23	NM_008348	<i>Il10ra</i>	4.72	<i>Itgb2</i>	5.14
24	NM_009778	<i>C3</i>	4.16	<i>Cxcr3</i>	5.04
25	NM_008518	<i>Ltb</i>	3.94	<i>Ccl19</i>	4.83
26	NM_009909	<i>Il18rb</i>	3.81	<i>Tnfrsf1b</i>	4.41
27	NM_008370	<i>Il15ra</i>	3.78	<i>Spp1</i>	4.15
28	NM_009910	<i>Cxcr3</i>	3.75	<i>Il2rg</i>	4.15
29	NM_009139	<i>Ccl16</i>	3.65	<i>Ccl16</i>	4.12
30	NM_011577	<i>Tgfb1</i>	3.65	<i>Ccr7</i>	4.09

cDNA samples are obtained from kidneys of 12-months-old mice. Values represent fold increase vs control groups. n=1.

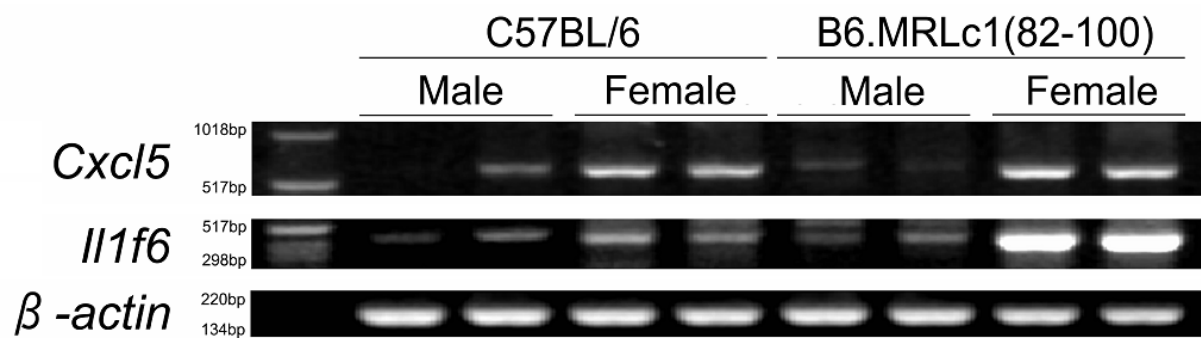


Fig. 4-1. RT-PCR analysis for *Cxcl5*, *Il1f6*, and *β-actin* mRNA expressions in the kidneys of 12-month-old C57BL/6 and B6.MRLc1(82-100) mice. The upper lane (*Cxcl5*), middle lane (*Il1f6*), and bottom lane (*β-actin*). Size markers are represented on the left. n = 2.

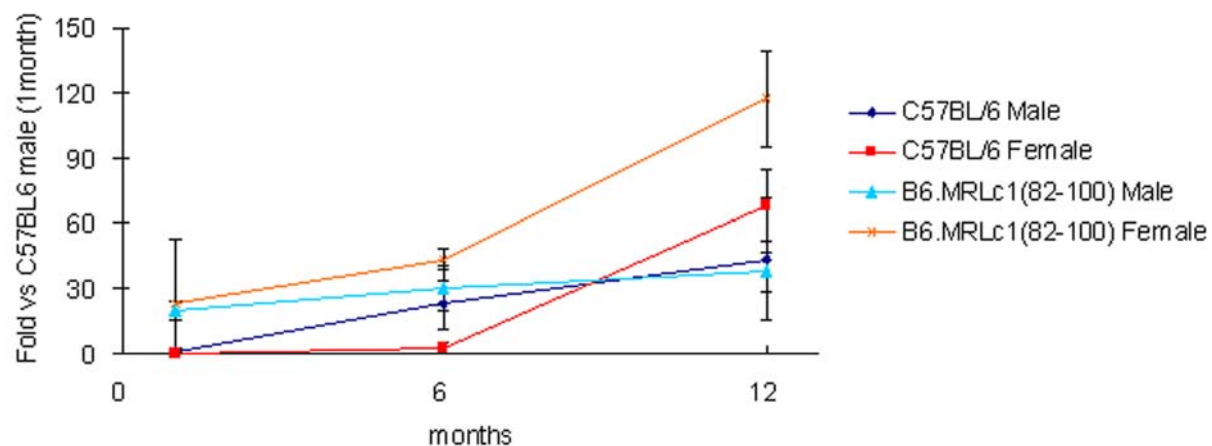


Fig. 4-2. Time course of *Cxcl5* mRNA expressions in kidneys of C57BL/6 and B6.MRLc1(82-100) mice by semi-quantitative RT-PCR analysis. C57BL/6 male (◆), C57BL/6 female (■), B6.MRLc1(82-100) male (▲), and B6.MRLc1(82-100) female (X). Raw values are normalized by that of *Actb* and values are expressed as fold increases compared to 1-month-old male C57BL/6. Each value represents the mean $\pm$ S.E. $n \geq 4$.

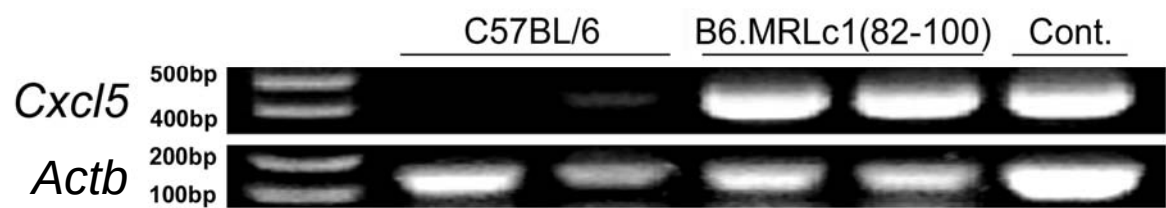


Fig. 4-3. RT-PCR analysis subsequent to laser microdissection for *Cxcl5* mRNA expressions in the glomerulus of 12-month-old female C57BL/6 and B6.MRLc1(82-100) mice. Five glomerulus were collected in each animal. The upper lane (*Cxcl5*) and bottom lane (*Actb*). Size markers are represented on the left. cDNA from kidney samples are used as control. n = 2.

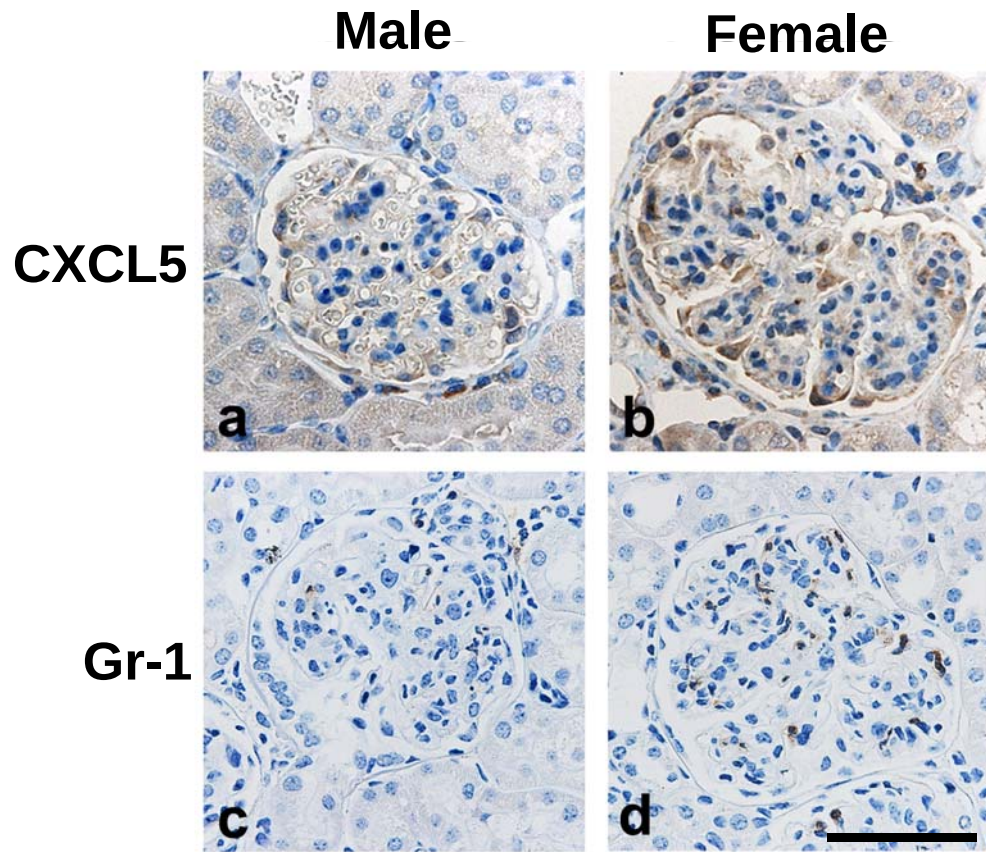


Fig. 4-4. Immunohistochemistry for CXCL5 and Gr-1 (neutrophil marker) in kidney of B6.MRLc1(82-100). (a) CXCL5 in male B6.MRLc1(82-100). (b) CXCL5 in female B6.MRLc1(82-100). (c) Gr-1 in male B6.MRLc1(82-100). (d) Gr-1 in female B6.MRLc1(82-100). In both sexes, CXCL5-positive reactions are observed in glomerular epithelial cells and infiltrating mononuclear cells (panels a and b). These reactions are strong in female B6.MRLc1(82-100). In female B6.MRLc1(82-100), several Gr-1-positive cells are infiltrating to glomeruli (panel d). However, these cells are few in male B6.MRLC1(82-100) (panel c). 12 month of age. Bar = 50 μ m.

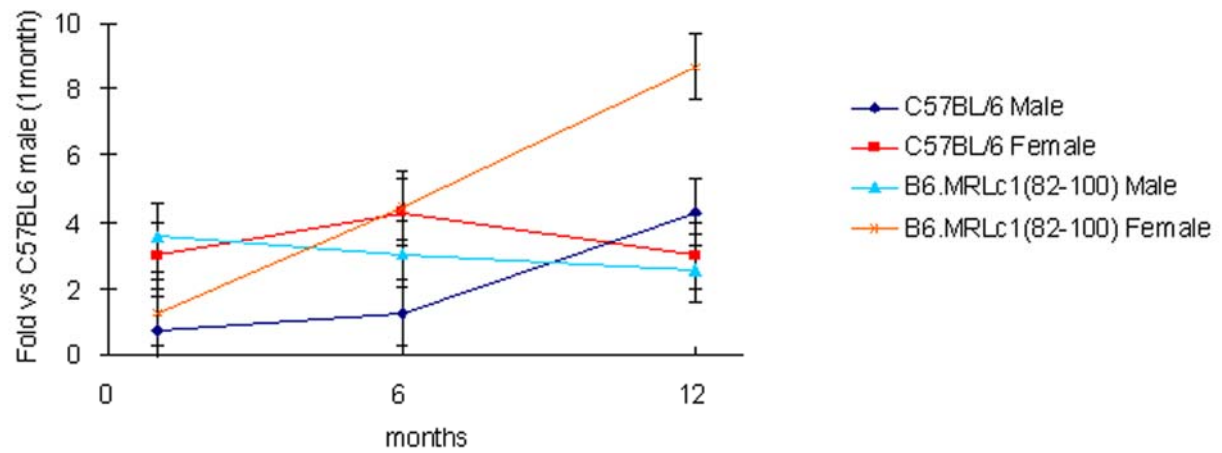


Fig. 4-5. Time course of *Il1f6* mRNA expression in kidneys of C57BL/6 and B6.MRLc1(82-100) mice by semi-quantitative RT-PCR analysis. C57BL/6 male (◆), C57BL/6 female (■), B6.MRLc1(82-100) male (▲), and B6.MRLc1(82-100) female (X). Raw values are normalized by that of *Actb* and values are expressed as fold increases compared to 1-month-old male C57BL/6. Each value represents the mean $\pm$ S.E. $n \geq 4$.

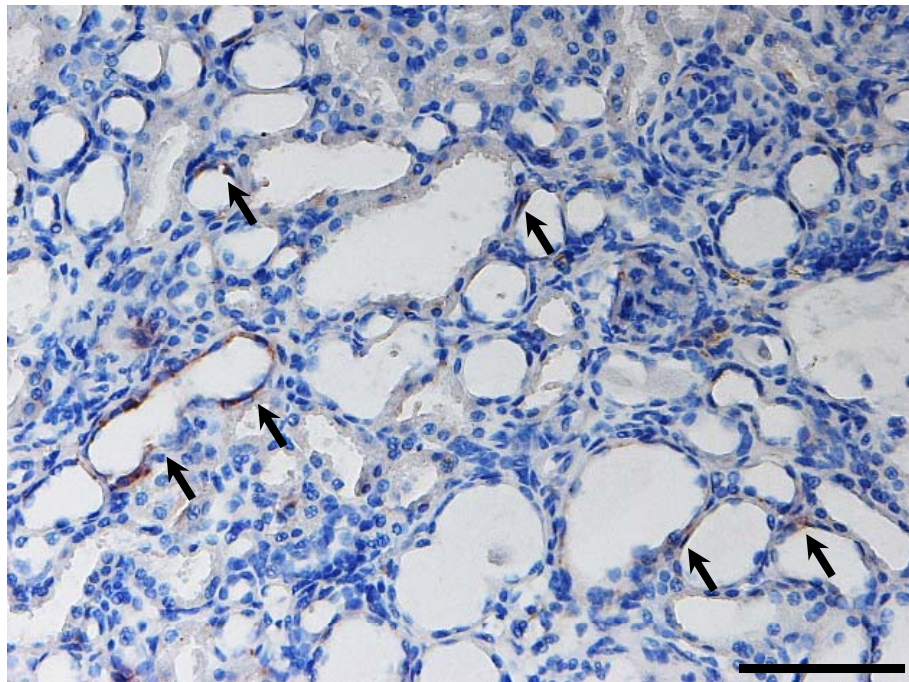


Fig. 4-6. In situ hybridization for *Illf6* in kidney of female B6.MRLc1(82-100) mice at 12 month of age. *Illf6*-positive reactions are mainly observed cytoplasm of dilated renal tubules (arrows). Bar = 100 μ m.

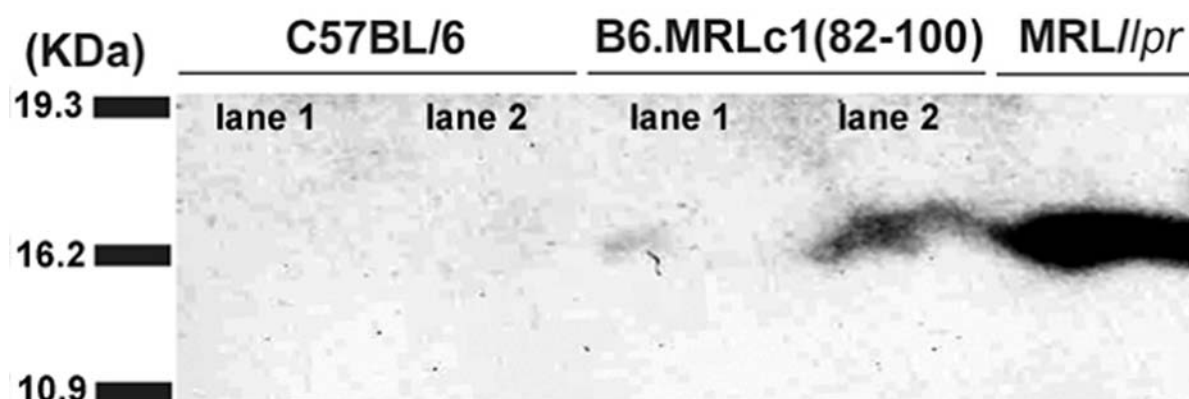


Fig. 4-7. Western blotting analysis for IL-1F6 in kidneys of C57BL/6, B6.MRLc1(82-100), and MRL-lpr mice. In B6.MRLc1(82-100) and MRL/lpr, IL-1F6 specific bands (approximately 17kDa) are observed, and intensity of band is the strongest in MRL/lpr which shows severe tubulointerstitial lesions. C57BL/6 and B6.MRLc1(82-100): 12-months-old, n = 2. MRL/*lpr*: 5-months-old, n = 1. Size markers are represented on the left.

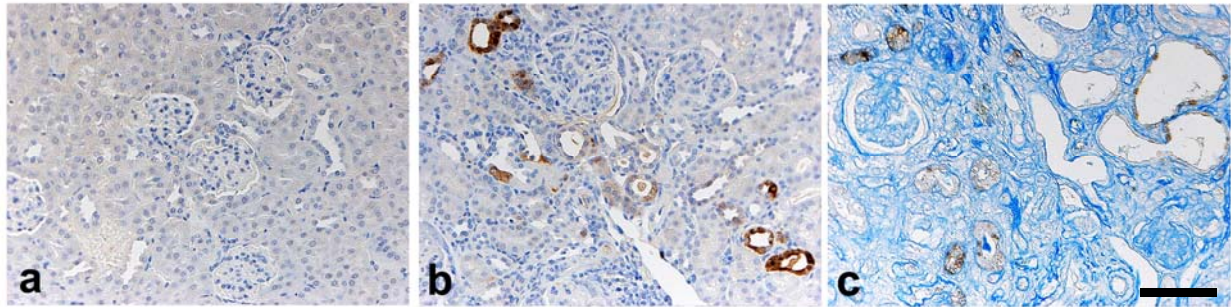


Fig. 4-8. Immunohistochemistry for IL-1F6 in kidney of B6.MRLc1(82-100). (a) male B6.MRLc1(82-100). (b) female B6.MRLc1(82-100). (c) female B6.MRLc1(82-100), counter-stained by aniline blue. No IL-1F6-positive reaction is observed in male B6.MRLc1(82-100) (panel a). However, in female B6.MRLc1(82-100), positive reactions are mainly observed cytoplasm and nuclear of distal convoluted tubules in addition to connecting ducts and cortical collecting ducts (panels b and c). Especially, these reactions are frequently observed in female B6.MRLc1(82-100) with severe tubulointerstitial lesions (panel c). 12 month of age. Bar = 100 μ m.

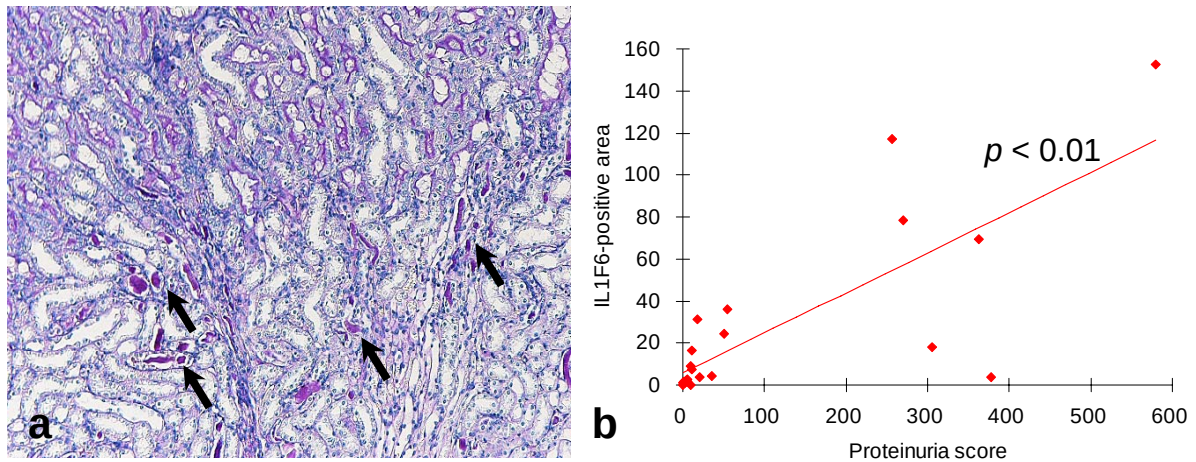


Fig. 4-9. The relations between proteinuria and number of IL-1F6-positive renal tubules. (a) Measurement of proteinuria score. Proteinuria scores are calculated by measuring the total number of renal tubules containing PAS-positive urinary casts (arrows). (b) Scatter plotting in number of IL-1F6-positive renal tubules and proteinuria score. The number of IL-1F6-positive area shows positive relations to proteinuria score. Values = means. ◆: Female B6.MRLc1(82-100). From 6 to 12 month of age. $n = 22$. Spearman's rank correlation coefficient ($p < 0.01$).

総 括

自己免疫性糸球体腎炎は全身性自己免疫疾患に合併し、主として血中を循環する免疫複合体が糸球体に沈着することで発症する。糸球体傷害の程度は患者の予後を左右する重要な指標である。これまで数種の疾患モデルマウスを用いて、第1染色体テロメア領域に複数の自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子座の存在することが報告されてきたが、これらの原因遺伝子座が同一の遺伝子に起因するか否かは不明である。本症の早期診断および新規治療法の確立のため、疾患モデルマウスにおける原因因子および増悪因子の同定は不可欠である。そこで本研究では、自己免疫疾患モデルマウスである MRL マウス由来第1染色体テロメア領域を有するコンジェニックマウスを作出し、自己免疫性糸球体腎炎モデルとしての有用性の確認、本症の病態解析、原因因子および増悪因子の検索を行った。

C57BL/6 マウスと (C57BL/6 X MRL/MpJ) F1 マウスとの戻し交配を繰り返し、マイクロサテライトマーカーを用いたジェノタイピング法によって、第1染色体テロメア領域 (82-100 cM) のみが MRL マウス型ホモであるコンジェニックマウス (B6. MRLc1 (82-100)) を作出した。B6. MRLc1 (82-100) マウスの病理組織学的解析において、6 ヶ月齢から軽度の糸球体病変が認められた。その糸球体基底膜は肥厚し、IgG1 および IgG2b の沈着が検出された。糸球体傷害はとくに雌で重篤であり、糸球体の増殖性病変および膜性病変は加齢性に増悪した。また、B6. MRLc1 (82-100) マウスの脾臓において B 細胞および T 細胞領域の拡大に起因する脾臓重量の増加が認められた。B6. MRLc1 (82-100) マウスの血中尿素窒素 (BUN) および抗 double strand DNA (dsDNA) 抗体濃度は加齢性に増加し、6 ヶ月齢で対照群の C57BL/6 マウスよりも有意に高値を示

した。以上の知見より、B6. MRLc1 (82-100) マウスは自己免疫性糸球体腎炎を発症し、MRL マウス由来自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子は第 1 染色体約 82-100 cM に座位することが明らかとなった。

著者は B6. MRLc1 (82-100) マウスの自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子座 (82-100cM) を *MRL autoimmune glomerulonephritis (Mag)* と命名した。原因遺伝子の存在領域をさらに狭めるため、*Mag* の一部を有するコンジェニックマウス B6. MRLc1 (82-86)、B6. MRLc1 (92-100) および B6. MRLc1 (100) を作出し、組織学的および分子生物学的手法により対照群の C57BL/6 マウスと比較解析した。3 系統の内、B6. MRLc1 (92-100) マウスにのみ免疫複合体の沈着を伴う糸球体傷害ならびに脾臓重量、血中 dsDNA 抗体濃度血中 BUN 濃度および尿中アルブミン排出の増加が認められた。これらの結果より、自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子の存在領域は 92-100 cM に狭められた。

原因遺伝子選抜のため、第 1 染色体 92-100 cM に存在する代表的な免疫関連遺伝子である C-reactive protein, pentraxin-related (*Crp*)、Serum amyloid P-component (*Apcs*)、Fc receptor IgG low affinity IIB (*Fcgr2b*) および *Fcgr3* の主要臓器における mRNA 相対発現量を解析した。B6. MRLc1 (92-100) マウスの腎臓、脾臓および胸腺では、*Fcgr3* の高発現および *Fcgr3/Fcgr2b* 比の上昇が認められた。これらのコード蛋白である抑制型 Fc γ 受容体 IIB (Fc γ RIIB) および活性化型 Fc γ RIII は腎糸球体メサンギウム領域および免疫器官の樹状細胞に局在し、これらの部位で B6. MRLc1 (92-100) マウスの Fc γ RIII 発現は C57BL/6 マウスよりも強く認められた。以上の知見より、第 1 染色体約 92.3 cM に存在する抑制型および活性化型 Fc γ R 遺伝子は原因遺伝子の候補として考えられ、両遺伝子のバランス変化が自己免疫性糸球体腎炎の病理発生に深く関与することが強く示唆された。

代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) では、女性が男性より

も高い発症率を示す。B6. MRLc1 (82-100) マウスの病態でも類似した雌雄差が認められ、雌が雄よりも重篤な糸球体腎炎を呈していた。この性差発現の一因として性ホルモンの影響が考えられたため、B6. MRLc1 (82-100) マウスに性腺摘出術あるいは擬手術を施し、性腺摘出が自己免疫性糸球体腎炎の病態に与える影響を解析した。擬手術群における雌雄差は脾臓重量、血清中総 IgG 濃度、血清中自己抗体濃度および糸球体傷害値で認められ、いずれも雌が雄よりも高値を示した。性腺摘出による影響は脾重量、尿中アルブミン濃度および糸球体傷害値で認められ、いずれも雄の性腺摘出群が擬手術群よりも高値を示した。また、腎臓における *Fcgr3/Fcgr2b* バランス解析で、擬手術群では雌が雄よりも有意に高値を、雄の性腺摘出群が擬手術群よりも有意に高値を示した。以上の所見より、B6. MRLc1 (82-100) マウスの自己免疫性糸球体腎炎の病態の雌雄差は、雄性ホルモンの病態抑制作用の影響を強く受けることが示唆された。

近年、SLE 患者の体液あるいは生検材料を用いた網羅的解析において、炎症性サイトカイン、ケモカインおよびそれらの受容体などの発現上昇が認められ、これらは病態制御のターゲットとして注目を集めている。そこで B6. MRLc1 (82-100) マウスの腎臓において、発現が上昇している炎症性メディエーターを PCR array 法で網羅的に解析し、自己免疫性糸球体腎炎増悪因子の同定を試みた。B6. MRLc1 (82-100) マウスの腎臓では、複数のケモカインリガンドおよびケモカイン受容体の遺伝子が顕著に高発現していた。とくに *Cxcl5* の相対発現量において、B6. MRLc1 (82-100) マウスは対照群の C57BL/6 マウスよりも 74 倍高い値を示した。B6. MRLc1 (82-100) マウス腎臓において CXCL5 は糸球体上皮細胞に局在し、その相対発現量は加齢性に増加していた。

一方、解析した遺伝子中、B6. MRLc1 (82-100) マウスで最も顕著に高発現していたのは IL-1 ファミリーの *Il1f6* であり、C57BL/6 マウスよりも 186 倍高値を示した。B6. MRLc1 (82-100) マウスの腎臓における *Il1f6* 発現量は加齢性に増加していた。*Il1f6*

の遺伝子および蛋白の発現は遠位尿細管から集合管にかけて認められ、とくに B6.MRLc1 (82-100) マウスの拡張した尿細管において強い発現が認められた。さらに、 IL-1F6 陽性尿細管数と蛋白尿の指標である蛋白円柱含有尿細管数との間に有意な正の相関が得られた。以上の結果より、B6.MRLc1 (82-100) マウスの腎臓で高発現する *Cxcl5* および *Il1f6* は糸球体局所および尿細管間質における病変の増悪因子として重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

結論として、本モデルマウスの解析によって、ゲノムに由来する自己免疫性糸球体腎炎原因遺伝子、性ホルモンおよび腎局所における病態増悪因子の量的変化が本症の病理発生に深く関与していることが明らかとなった。今回得られた結果は、医学および獣医学領域における本症の早期診断法および治療法の発展において重要な基礎的知識となるだろう。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座解剖学教室 昆 泰寛 教授、橋本善春 准教授ならびに今野明弘 前助教、さらには多くの御助言を下さいました酪農学園大学獣医学部獣医学科放射線学教室 遠藤大二 教授ならびに北海道大学大学院獣医学研究科動物疾病制御学講座実験動物学教室 佐々木宣哉 准教授に深謝いたします。また、本論文のご校閲を賜りました北海道大学大学院獣医学研究科診断治療学講座比較病理学教室 梅村 孝司 教授ならびに同講座臨床分子生物学教室 稲葉 睦 教授に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多くの助言と励ましを頂きました大塚沙織さんをはじめとする同輩諸氏、援助を惜しまれなかった金澤智則さんをはじめとする後輩諸氏、ならびに北海道大学獣医学研究科動物飼育施設の村上重美 技術専門員をはじめとする施設の皆様に心から感謝いたします。皆様、本当に有難うございました。

最後に、本研究を支えた多くの動物達に哀悼の意を表し、深く感謝します。

参考文献

1. Ackerman L.S. (2006). Sex hormones and the genesis of autoimmunity. *Arch. Dermatol.* 142, 371-376.
2. Ahmed S.A., Hissong B.D., Verthelyi D., Donner K., Becker K. and Karpuzoglu-Sahin E. (1999). Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environ. Health Perspect.* 5:681-686.
3. Aiba M., Murakami A., Funami M. and Takaba T. (1991). A study of glomerular damage due to extracorporeal circulation meaning and usefulness of measuring of urinary microalbumin. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 39, 68-75.
4. Akhtar M. and Al Mana H. (2004). Links Molecular basis of proteinuria. *Adv. Anat. Pathol.* 11, 304-309.
5. Akilesh S., Huber T.B., Wu H., Wang G., Hartleben B., Kopp J.B., Miner J.H., Roopenian D.C., Unanue E.R. and Shaw A.S. (2008). Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 967-972.
6. Andrews B.S., Eisenberg R.A., Theofilopoulos A.N., Izui S., Wilson C.B., McConahey P.J., Murphy E.D., Roths J.B. and Dixon F.J. (1978). Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* 148, 1198-1215.
7. Balomenos D., Rumold R. and Theofilopoulos A.N. (1998). Interferon-gamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *J.*

- Clin. Invest.* 101, 364-371.
8. Barksby H.E., Lea S.R., Preshaw P.M. and Taylor J.J. (2007). The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin. Exp. Immunol.* 149, 217-225.
 9. Bell D.A., Clark C., Blomgren S.E. and Vaughan J.H. (1973). Anti DNA antibody production by lymphoid cells of NZB-W mice and human systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1, 293-303.
 10. Bickerstaff M.C., Botto M., Hutchinson W.L., Herbert J., Tennent G.A., Bybee A., Mitchell D.A., Cook H.T., Butler P.J., Walport M.J. and Pepys M.B. (1999). Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity. *Nat. Med.* 5, 694-697.
 11. Blank M.C., Stefanescu R.N., Masuda E., Marti F., King P.D., Redecha P.B., Wurzbarger R.J., Peterson M.G., Tanaka S. and Pricop L. (2005). Decreased transcription of the human FCGR2B gene mediated by the -343 G/C promoter polymorphism and association with systemic lupus erythematosus. *Hum. Genet.* 117, 220-227.
 12. Blantz R.C., Peterson O.W., Blantz E.R. and Wilson C.B. (1988). Sexual differences in glomerular ultrafiltration: effect of androgen administration in ovariectomized rats. *Endocrinology* 122, 767-773.
 13. Blumberg H., Dinh H., Trueblood E.S., Pretorius J., Kugler D., Weng N., Kanaly S.T., Towne J.E., Willis C.R., Kuechle M.K., Sims J.E. and Peschon J.J. (2007). Opposing activities of two novel members of the IL-1 ligand family regulate skin inflammation. *J. Exp. Med.* 204, 2603-2614.

14. Bolland S. and Ravetch J.V. (2000). Spontaneous autoimmune disease in Fc (gamma) RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* 13, 277-285.
15. Boruchov A.M., Heller G., Veri M.C., Bonvini E., Ravetch J.V. and Young J.W. (2005). Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J. Clin. Invest.* 115, 2914-2923.
16. Bouman A., Schipper M., Heineman M.J. and Faas M.M. (2004). Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans. *Am. J. Reprod. Immunol.* 52, 19-26.
17. Bouman A., Heineman M.J. and Faas M.M. (2005). Sex hormones and the immune response in humans. *Hum. Reprod. Update.* 11, 411-423.
18. Cantor R.M., Yuan J., Napier S., Kono N., Grossman J.M., Hahn B.H., Tsao B.P. (2004). Systemic lupus erythematosus genome scan: support for linkage at 1q23, 2q33, 16q12-13, and 17q21-23 and novel evidence at 3p24, 10q23-24, 13q32, and 18q22-23. *Arthritis Rheum.* 50, 3203-3210.
19. Chang D.M., Chang C.C., Kuo S.Y., Chu S.J. and Chang M.L. (1999). Hormonal profiles and immunological studies of male lupus in Taiwan. *Clin. Rheumatol.* 18, 158-162.
20. Chen J.Y., Wang C.M., Lu S.C., Chou Y.H., and Luo S.F. (2006). Association of apoptosis-related microsatellite polymorphisms on chromosome 1q in Taiwanese systemic lupus erythematosus patients. *Clin. Exp. Immunol.* 143, 281-287.
21. Chu Z.T., Tsuchiya N., Kyogoku C., Ohashi J., Qian Y.P., Xu S.B., Mao C.Z.,

- Chu J.Y. and Tokunaga K. (2004). Association of Fc γ receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. *Tissue Antigens* 63, 21-27.
22. Clynes R., Dumitru C. and Ravetch J.V. (1998). Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science* 279, 1052-1054.
23. Cohen P.L. and Eisenberg R.A. (1991). Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 243-269.
24. Cutolo M., Sulli A., Capellino S., Villaggio B., Montagna P., Seriolo B. and Straub R.H. (2004). Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus* 13, 635-638.
25. Desai D.D., Harbers S.O., Flores M., Colonna L., Downie M.P., Bergtold A., Jung S. and Clynes R. (2007). Fc gamma receptor IIB on dendritic cells enforces peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses. *J. Immunol.* 178, 6217-6226.
26. Du Clos T.W., Zlock L.T., Hicks P.S. and Mold C. (1994). Decreased autoantibody levels and enhanced survival of (NZB x NZW) F1 mice treated with C-reactive protein. *Clin. Immunol. Immunopath.* 70, 22-27.
27. Duchene J., Lecomte F., Ahmed S., Cayla C., Pesquero J., Bader M., Perretti M. and Ahluwalia A. (2007). A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin B1 receptor and the chemokine CXCL5. *J. Immunol.* 179, 4849-4856.

28. Durum S.K., Lee C.K., Geiman T.M., Murphy W.J. and Muegge K. (1998). CD16 cross-linking blocks rearrangement of the TCR beta locus and development of alpha beta T cells and induces development of NK cells from thymic progenitors. *J. Immunol.* 161, 3325-3329.
29. Elliot S.J., Berho M., Korach K., Doublier S., Lupia E., Striker G.E. and Karl M. (2007). Gender-specific effects of endogenous testosterone: female alpha-estrogen receptor-deficient C57Bl/6J mice develop glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 72, 464-472.
30. Exaire E., Pollak V.E., Pesce A.J. and Ooi B.S. (1972). Albumin and -globulin in the nephron of the normal rat and following the injection of aminonucleoside. *Nephron* 9, 42-54.
31. Ferluga D., Jerse M., Vizjak A., Hvala A., Rozman B., Kos-Golja M. and Bren A.F. (2000). Correlation among WHO classes, histomorphologic patterns of glomerulonephritis and glomerular immune deposits in SLE. *Wien. Klin. Wochenschr.* 112, 692-701.
32. Floege J., Radeke H.R. and Johnson R.J. (1994). Glomerular cells in vitro versus the glomerulus in vivo. *Kidney Int.* 45, 360-368.
33. Fujii T., Hamano Y., Ueda S., Akikusa B., Yamasaki S., Ogawa M., Saisho H., Verbeek J.S., Taki S. and Saito T. (2003). Predominant role of Fc gamma RIII in the induction of accelerated nephrotoxic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 64, 1406-1416.
34. Fukami K., Ueda S., Yamagishi S., Kato S., Inagaki Y., Takeuchi M., Motomiya Y., Bucala R., Iida S., Tamaki K., Imaizumi T., Cooper M.E. and Okuda S. (2004).

- AGEs activate mesangial TGF-beta-Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction. *Kidney Int.* 2004; 66: 2137-2147.
35. Gobe G.C. and Johnson D.W. (2007). Distal tubular epithelial cells of the kidney: Potential support for proximal tubular cell survival after renal injury. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1551-1561.
 36. Graves D.T. and Cochran D. (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J. Periodontol.* 74, 391-401.
 37. Grimaldi C.M., Cleary J., Dagtas A.S., Moussai D. and Diamond B. (2002). Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J. Clin. Invest.* 109, 1625-1633.
 38. Grimaldi C.M., Hill L., Xu X., Peeva E. and Diamond B. (2005). Hormonal modulation of B cell development and repertoire selection. *Mol. Immunol.* 42, 811-820.
 39. Han G.M., Chen S.L., Shen N., Ye S., Bao C.D. and Gu Y.Y. (2003). Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. *Genes Immun.* 4, 177-186.
 40. Hatta Y., Tsuchiya N., Ohashi J., Matsushita M., Fujiwara K., Hagiwara K., Juji T. and Tokunaga K. (1999). Association of Fc γ receptor IIIB, but not of Fc γ receptor IIA and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun.* 1, 53-60.
 41. Haywood M.E., Rose S.J., Horswell S., Lees M.J., Fu G., Walport M.J. and Morley B.J. (2006). Overlapping BXSb congenic intervals, in combination with

- microarray gene expression, reveal novel lupus candidate genes. *Genes Immun.* 7, 250–263.
42. He X., Schoeb T.R., Panoskaltsis-Mortari A., Zinn K.R., Kesterson R.A., Zhang J., Samuel S., Hicks M.J., Hickey M.J. and Bullard D.C. (2006). Deficiency of P-selectin or P-selectin glycoprotein ligand-1 leads to accelerated development of glomerulonephritis and increased expression of CC chemokine ligand 2 in lupus-prone mice. *J. Immunol.* 177, 8748–8756.
 43. Henry T. and Mohan C. (2005). Systemic lupus erythematosus recent clues from congenic strains. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 53, 207–212.
 44. Herrada A.A., Contreras F.J., Tobar J.A., Pacheco R. and Kalergis A.M. (2007). Immune complex-induced enhancement of bacterial antigen presentation requires Fc γ receptor III expression on dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13402–13407.
 45. Hill G.S., Delahousse M., Nochy D. and Bariéty J. (2005). Class IV-S versus class IV-G lupus nephritis: clinical and morphologic differences suggesting different pathogenesis. *Kidney Int.* 68, 2288–2297.
 46. Honda S., Nemoto K., Mae T., Kinjoh K., Kyogoku M., Kawamura H., Miyazawa S., Weerasinghe A., Watanabe H., Narita J., Koya T., Arakawa M. and Abo T. (1999). Mice with early onset of death (EOD) due to lupus glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 116, 153–163.
 47. Hora K, Satriano JA, Santiago A, et al. Receptors for IgG complexes activate synthesis of monocyte chemoattractant peptide 1 and colony-stimulating factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 1745–1749.

48. Hueber W., Zeng D., Strober S. and Utz P.J. (2004). Interferon-alpha-inducible proteins are novel autoantigens in murine lupus. *Arthritis Rheum.* 50, 3239-3249
49. Hvala A., Kobenter T. and Ferluga D. (2000). Fingerprint and other organised deposits in lupus nephritis. *Wien. Klin. Wochenschr.* 112, 711-715.
50. Ishii T., Onda H., Tanigawa A., Ohshima S., Fujiwara H., Mima T., Katada Y., Deguchi H., Suemura M., Miyake T., Miyatake K., Kawase I., Zhao H., Tomiyama Y., Saeki Y. and Nojima H. (2006). Isolation and expression profiling of genes upregulated in the peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *DNA Res.* 12, 429-439.
51. Ito M.R., Ono M., Itoh J. and Nose M. (2003). Bone marrow cell transfer of autoimmune diseases in a MRL strain of mice with a deficit in functional Fas ligand: dissociation of arteritis from glomerulonephritis. *Pathol. Int.* 53, 518-524.
52. Izui S., Kelley V.E., Masuda K., Yoshida H., Roths J.B. and Murphy E.D. (1984). Induction of various autoantibodies by mutant gene *lpr* in several strains of mice. *J. Immunol.* 133, 227-233.
53. Izui S., Merino R., Fossati L. and Iwamoto M. (1994). The role of the *Yaa* gene in lupus syndrome. *Int. Rev. Immunol.* 11, 211-230.
54. Jiang Y., Hirose S., Abe M. and Sanokawa-Akakura R., Ohtsui M., Mi X., Li N., Xiu Y., Zhang D., Shirai J., Hamano Y., Fujii H. and Shirai T. (2000). Polymorphisms in IgG Fc receptor IIB regulatory regions associated with autoimmune susceptibility. *Immunogenetics* 51, 429-435.

55. Johnstone R.W. and Trapani J.A. (1999). Transcription and growth regulatory functions of the HIN-200 family of proteins. *Mol. Cell Biol.* 19, 5833-5838.
56. Kamogawa J., Terada M., Mizuki S., Nishihara M., Yamamoto H., Mori S., Abe Y., Morimoto K., Nakatsuru S., Nakamura Y. and Nose M. (2002). Arthritis in MRL/lpr mice is under the control of multiple gene loci with an allelic combination derived from the original inbred strains. *Arthritis Rheum.* 46, 1067-1074.
57. Kay J. and Calabrese L. (2004). The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 43, 2-9.
58. Kelley V.E. and Roths J.B. (1985). Interaction of mutant lpr gene with background strain influences renal disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 37, 220-229.
59. Kida Y. and Sato T. (2007). Tubular changes in obstructed kidney of adult mice evaluated using immunohistochemistry for segment-specific marker. *Histol. Histopathol.* 22, 291-303.
60. Klinman D.M. and Steinberg A.D. (1995). Inquiry into murine and human lupus. *Immunol. Rev.* 144, 157-193.
61. Koch A.E. (2005). Chemokines and their receptors in rheumatoid arthritis: future targets? *Arthritis Rheum.* 52, 710-721.
62. Koch A.E., Kunkel S.L., Harlow L.A., Mazarakis D.D., Haines G.K., Burdick M.D., Pope R.M., Walz A. and Strieter R.M. (1994). Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. *J. Clin. Invest.* 94, 1012-1018.

63. Koene H.R., Kleijer M., Swaak A.J., Sullivan K.E., Bijl M., Petri M.A., Kallenberg C.G., Roos D., von dem Borne A.E. and de Haas M. (1998). The Fc γ RIIIA-158F allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 41, 1813-1818.
64. Kon Y. and Endoh D. (2000). Morphological study of metaphase-specific apoptosis in MRL mouse testis. *Anat. Histol. Embryol.* 29, 313-319.
65. Kon Y., Horikoshi H. and Endoh D. (1999). Metaphase-specific cell death in meiotic spermatocytes in mice. *Cell Tissue Res.* 296, 359-369.
66. Kornman K.S., Page R.C. and Tonetti M.S. (1997). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol.* 2000 14, 33-53.
67. Kyogoku C., Dijstelbloem H.M., Tsuchiya N., Hatta Y., Kato H., Yamaguchi A., Fukazawa T., Jansen M.D., Hashimoto H., van de Winkel J.G., Kallenberg C.G. and Tokunaga K. (2002). Fc γ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum.* 46, 1242-1254.
68. Kyttaris V.C., Sfrikakis P.P., Juang Y.T. and Tsokos G.C. (2005). Gene therapy in systemic lupus erythematosus. *Curr. Gene Ther.* 5, 677-684.
69. Lahita R.G. and Bradlow H.L. (1987). Klinefelter's syndrome: hormone metabolism in hypogonadal males with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol. Suppl* 13, 154-157.
70. Leferovich J.M., Bedelbaeva K., Samulewicz S., Zhang X.M., Zwas D., Lankford E.B. (2001). Heber-Katz E. Heart regeneration in adult MRL mice. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U. S. A. 98, 9830-9835.

71. Lin Q., Xiu Y., Jiang Y., Tsurui H., Nakamura K., Koder S., Ohtsuji M., Ohtsuji N., Shiroyiwa W., Tsukamoto K., Amano H., Amano E., Kinoshita K., Sudo K., Nishimura H., Izui S., Shirai T. and Hirose S. (2006). Genetic dissection of the effects of stimulatory and inhibitory IgG Fc receptors on murine lupus. *J. Immunol.* 177, 1646-1654.
72. Liu H.C., Liao T.N., Lee T.C., Chuang L.Y., Guh J.Y., Liu S.F., Hu M.S., Yang Y.L., Lin S.H., Hung M.Y., Huang J.S., Hung T.J., Chen C.D., Chiang T.A., Chan J.Y., Chen S.Y. and Yang Y.L. (2006). Albumin induces cellular fibrosis by upregulating transforming growth factor-beta ligand and its receptors in renal distal tubule cells. *J. Cell Biochem.* 97, 956-968.
73. Magne D., Palmer G., Barton J.L., Mézin F., Talabot-Ayer D., Bas S., Duffy T., Noger M., Guerne P.A., Nicklin M.J. and Gabay C. (2006). The new IL-1 family member IL-1F8 stimulates production of inflammatory mediators by synovial fibroblasts and articular chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* 8, 80.
74. Masinde G.L., Li X., Gu W., Davidson H., Mohan S. and Baylink D.J. (2001). Identification of wound healing/regeneration quantitative trait loci (QTL) at multiple time points that explain seventy percent of variance in (MRL/MpJ and SJL/J) mice F2 population. *Genome Res.* 11, 2027-2033.
75. Matsumoto K., Watanabe N., Akikusa B., Kurasawa K., Matsumura R., Saito Y., Iwamoto I. and Saito T. (2003). Fc receptor-independent development of autoimmune glomerulonephritis in lupus-prone MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 48, 486-494.

76. McMurray R.W., Suwannaroj S., Ndebele K. and Jenkins J.K. (2001). Differential effects of sex steroids on T and B cells : modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels. *Pathobiology*. 69, 44-58.
77. Mechetina L.V., Najakshin A.M., Alabyev B.Y., Chikaev N.A. and Taranin A.V. (2002). Identification of CD16-2, a novel mouse receptor homologous to CD16/Fc gamma RIII. *Immunogenetics* 54, 463-468.
78. Meyer T.N., Schwesinger C., Wahlefeld J., Dehde S., Kerjaschki D., Becker J.U., Stahl R.A. and Thaiss F. (2007). A new mouse model of immune-mediated podocyte injury. *Kidney Int.* 72, 841-852.
79. Milner J.M. and Cawston T.E. (2005). Matrix metalloproteinase knockout studies and the potential use of matrix metalloproteinase inhibitors in the rheumatic diseases. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 4, 363-375.
80. Misu N., Zhang M., Mori S., Miyazaki T., Furukawa H., Sasaki T., Nose M. and Ono M. (2007). Autosomal loci associated with a sex-related difference in the development of autoimmune phenotypes in a lupus model. *Eur. J. Immunol.* 37, 2787-2796.
81. Miyazaki T., Ono M., Qu W.M., Zhang M.C., Mori S., Nakatsuru S., Nakamura Y., Sawasaki T., Endo Y. and Nose M. (2005). Implication of allelic polymorphism of osteopontin in the development of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Eur. J. Immunol.* 35, 1510-1520.
82. Mold C., Gresham H.D. and Du Clos T.W. (2001). Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine Fc γ Rs. *J. Immunol.* 166, 1200-1205.

83. Moser K.L., Neas B.R., Salmon J.E., Yu H., Gray-McGuire C., Asundi N., Bruner G.R., Fox J., Kelly J., Henshall S., Bacino D., Dietz M., Hogue R., Koelsch G., Nightingale L., Shaver T., Abdou N.I., Albert D.A., Carson C., Petri M., Treadwell E.L., James J.A. and Harley J.B. (1998). Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14869-14874.
84. Namiki Y., Kon Y., Kazusa K., Asano A., Sasaki N. and Agui T. (2005). Quantitative trait loci analysis of heat stress resistance of spermatocytes in the MRL/MpJ mouse. *Mamm. Genome* 16, 96-102.
85. Nikpour M., Dempsey A.A., Urowitz M.B., Gladman D.D. and Barnes D.A. (2007). Association of a gene expression profile from whole blood with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* Epub ahead of print.
86. Nzeusseu Toukap A., Galant C., Theate I., Maudoux A.L., Lories R.J., Houssiau F.A. and Lauwerys B.R. (2007). Identification of distinct gene expression profiles in the synovium of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 56, 1579-1588.
87. Obineche E.N., Mensah-Brown E., Chandranath S.I., Ahmed I., Naseer O. and Adem A. (2001). Morphological changes in the rat kidney following long-term diabetes. *Arch. Physiol. Biochem.* 109, 241-245.
88. Ono S., Tsujimoto H., Hiraki S., Takahata R., Kinoshita M. and Mochizuki H. Sex differences in cytokine production and surface antigen expression of peripheral blood mononuclear cells after surgery. *Am. J. Surg.* 190, 439-444.

89. Oudar O., Elger M., Bankir L., Ganten D., Ganten U. and Kriz W. (1991). Differences in rat kidney morphology between males, females and testosterone-treated females. *Ren. Physiol. Biochem.* 14, 92-102.
90. Papoian R., Pillarisetty R. and Talal N. (1977). Immunological regulation of spontaneous antibodies to DNA and RNA. II. Sequential switch from IgM to IgG in NZB/NZW F1 mice. *Immunology* 32, 75-79.
91. Pisetsky D. S., McCarty G. A. and Peters D. V. (1980). Mechanisms of autoantibody production in autoimmune MRL mice. *J. Exp. Med.* 152, 1302-1310.
92. Pisitkun P., Deane J. A., Difilippantonio M. J., Tarasenko T., Satterthwaite A. B. and Bolland S. (2006). Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science*, 312, 1669-1672.
93. Potier M., Elliot S. J., Tack I., Lenz O., Striker G. E., Striker L. J. and Karl M. (2001). Expression and regulation of estrogen receptors in mesangial cells: influence on matrix metalloproteinase-9. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 241-251.
94. Qing X. and Putterman C. (2004). Gene expression profiling in the study of the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* 3, 505-509.
95. Radeke H. H. and Resch K. (1992). The inflammatory function of renal glomerular mesangial cells and their interaction with the cellular immune system. *Clin. Investig* 70, 825-842.
96. Radeke H. H., Emmendörffer A., Uciechowski P., von der Ohe J., Schwinzer B. and Resch K. (1994). Activation of autoreactive T-lymphocytes by cultured syngeneic glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 45, 763-774.
97. Radeke H. H., Janssen-Graalfs I., Sowa E. N., Chouchakova N., Skokowa J.,

- Löscher F., Schmidt R.E., Heeringa P. and Gessner J.E. (2002). Opposite regulation of type II and III receptors for immunoglobulin G in mouse glomerular mesangial cells and in the induction of anti-glomerular basement membrane (GBM) nephritis. *J. Biol. Chem.* 277, 27535-27544.
98. Radeke H.H., Meier B., Topley N., Flöge J., Habermehl G.G. and Resch K. (1990). Interleukin 1-alpha and tumor necrosis factor-alpha induce oxygen radical production in mesangial cells. *Kidney Int.* 37, 767-775.
99. Ravetch J.V. and Bolland S. IgG Fc receptors. (2001). *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275-290.
100. Regnault A., Lankar D., Lacabanne V., Rodriguez A., Théry C., Rescigno M., Saito T., Verbeek S., Bonnerot C., Ricciardi-Castagnoli P. and Amigorena S. (1999). Fc γ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189, 371-380.
101. Reth M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* 338, 383-384.
102. Reynolds J., Albouainain A., Duda M.A., Evans D.J. and Pusey C.D. (2006). Strain susceptibility to active induction and passive transfer of experimental autoimmune glomerulonephritis in the rat. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21, 3398-3408.
103. Roubinian J.R., Papoian R. and Talal N. (1977). Androgenic hormones modulate autoantibody responses and improve survival in murine lupus. *J. Clin. Invest.* 59, 1066-1070.
104. Roubinian J.R., Talal N., Greenspan J.S., Goodman J.R. and Siiteri P.K.

- (1978). Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. *J. Exp. Med.* 147, 1568-1583.
105. Rozzo S. J., Allard J. D., Choubey D., Vyse T. J., Izui S., Peltz G. and Kotzin B. L. (2001). Evidence for an interferon-inducible gene, Ifi202, in the susceptibility to systemic lupus. *Immunity* 15, 435-443.
 106. Rozzo S. J., Vyse T. J., Drake C. G. and Kotzin B. L. (1996). Effect of genetic background on the contribution of New Zealand black loci to autoimmune lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15164-15168.
 107. Rudofsky U. H., Dilwith R. L., Roths J. B., Lawrence D. A., Kelley V. E. and Magro A. M. (1984). Differences in the occurrence of hypertension among (NZB X NZW)F1, MRL-lpr, and BXSB mice with lupus nephritis. *Am. J. Pathol.* 116, 107-114.
 108. Sabolić I., Asif A. R., Budach W. E., Wanke C., Bahn A. and Burckhardt G. (2007). Gender differences in kidney function. *Pflugers Arch.* 455, 397-429.
 109. Santiago-Raber M. L., Laporte C., Reininger L. and Izui S. (2004). Genetic basis of murine lupus. *Autoimmun. Rev.* 3, 33-39.
 110. Schiebler T. H. and Danner K. G. (1978). The effect of sex hormones on the proximal tubules in the rat kidney. *Cell Tissue Res.* 192, 527-549.
 111. Segerer S., Nelson P. J. and Schlöndorff D. (2000). Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 152-176.
 112. Shai R., Quismorio F. P. Jr., Li L., Kwon O. J., Morrison J., Wallace D. J.,

- Neuwelt C.M., Brautbar C., Gauderman W.J. and Jacob C.O. (1999). Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families. *Hum. Mol. Genet.* 8, 639-644.
113. Shimizu S., Sugiyama N., Masutani K., Sadanaga A., Miyazaki Y., Inoue Y., Akahoshi M., Katafuchi R., Hirakata H., Harada M., Hamano S., Nakashima H. and Yoshida H. (2005). Membranous glomerulonephritis development with Th2-type immune deviations in MRL/lpr mice deficient for IL-27 receptor (WSX-1). *J. Immunol.* 175, 7185-7192.
114. Siriboonrit U., Tsuchiya N., Sirikong M., Kyogoku C., Bejrachandra S., Suthipinittharm P., Luangtrakool K., Srinak D., Thongpradit R., Fujiwara K., Chandanayingyong D. and Tokunaga K. (2003). Association of Fc γ receptor IIb and IIIb polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* 61, 374-383.
115. Soto M.E., Vallejo M., Guillen F., Simon J.A., Arena E. and Reyes P.A. (2004). Gender impact in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol.* 22, 713-721.
116. Stetler D.A., Sipes D.E. and Jacob S.T. (1985). Anti-RNA polymerase I antibodies in sera of MRL lpr/lpr and MRL +/+ autoimmune mice. Correlation of antibody production with delayed onset of lupus-like disease in MRL +/+ mice. *J. Exp. Med.* 162, 1760-1770.
117. Steward M.W. and Hay F.C. (1976). Changes in immunoglobulin class and subclass of anti-DNA antibodies with increasing age in N/ZBW F1 hybrid mice. *Clin. Exp. Immunol.* 26, 363-370.

118. Sthoeger Z.M., Zinger H. and Mozes E. (2003). Beneficial effects of the anti-oestrogen tamoxifen on systemic lupus erythematosus of (NZBxNZW)F1 female mice are associated with specific reduction of IgG3 autoantibodies. *Ann. Rheum. Dis.* 62, 341-346.
119. Takai T. (2005a). Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *J. Clin. Immunol.* 25, 1-18.
120. Takai T. (2005b). Role of Fc gamma receptors in immune regulation and diseases. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 28, 318-326.
121. Takai T., Ono M., Hikida M., Ohmori H. and Ravetch J.V. (1996). Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc γ RII-deficient mice. *Nature* 379, 346-349.
122. Tay A.H., Ren E.C., Murugasu B., Sim S.K., Tan P.H., Cohen A.H. and Yap H.K. (2000). Membranous nephropathy with anti-tubular basement membrane antibody may be X-linked. *Pediatr. Nephrol.* 14, 747-53.
123. Teramoto K., Negoro N., Kitamoto K., Iwai T., Iwao H., Okamura M. and Miura K. (2008). Microarray analysis of glomerular gene expression in murine lupus nephritis. *J. Pharmacol. Sci.* 106, 56-67.
124. Thomas M.E. and Schreiner G.F. (1993). Contribution of proteinuria to progressive renal injury: consequences of tubular uptake of fatty acid bearing albumin. *Am. J. Nephrol.* 13, 385-398.
125. Thomas M.E., Brunskill N.J., Harris K.P., Bailey E., Pringle J.H., Furness P.N. and Walls J. (1999). Proteinuria induces tubular cell turnover: A potential mechanism for tubular atrophy. *Kidney Int.* 55, 890-898

126. Towne J. E., Garka K. E., Renshaw B. R., Virca G. D. and Sims J. E. Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappaB and MAPKs. *J. Biol. Chem.* 279, 13677-13688.
127. Venkat K. K. (2004). Proteinuria and microalbuminuria in adults: significance, evaluation, and treatment. *South Med. J.* 97, 969-979.
128. Viselli S. M., Stanziale S., Shults K., Kovacs W. J. and Olsen N. J. (1995). Castration alters peripheral immune function in normal male mice. *Immunology* 84, 337-342.
129. Walz A., Schmutz P., Mueller C. and Schnyder-Candrian S. (1997). Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease. *J. Leukoc. Biol.* 62, 604-611.
130. Wang H., Chatterjee G., Meyer J. J., Liu C. J., Manjunath N. A., Bray-Ward P. and Lengyel P. (1999). Characteristics of three homologous 202 genes (Ifi202a, Ifi202b, and Ifi202c) from the murine interferon-activatable gene 200 cluster. *Genomics.* 60, 281-294.
131. Wang Y., Nose M., Kamoto T., Nishimura M. and Hiai H. (1997). Host modifier genes affect mouse autoimmunity induced by the lpr gene. *Am. J. Pathol.* 151, 1791-1798.
132. Watanabe-Fukunaga R., Brannan C. I., Copeland N. G., Jenkins N. A. and Nagata S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317.
133. Weening J. J., D'Agati V. D., Schwartz M. M., Seshan S. V., Alpers C. E., Appel G. B., Balow J. E., Bruijn J. A., Cook T., Ferrario F., Fogo A. B., Ginzler E. M.,

- Hebert L., Hill G., Hill P., Jennette J.C., Kong N.C., Lesavre P., Lockshin M., Looi L.M., Makino H., Moura L.A., and Nagata M. (2004). The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int.* 65: 521-530.
134. Westacott C.I., Whicher J.T., Barnes I.C., Thompson D., Swan A.J. and Dieppe P.A. Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 49, 676-681.
135. Wu H., Boackle S.A., Hanvivadhanakul P., Ulgiati D., Grossman J.M., Lee Y., Shen N., Abraham L.J., Mercer T.R., Park E., Hebert L.A., Rovin B.H., Birmingham D.J., Chang D.M., Chen C.J., McCurdy D., Badsha H.M., Thong B.Y., Chng H.H., Arnett F.C., Wallace D.J., Yu C.Y., Hahn B.H., Cantor R.M., and Tsao B.P. (2007). Association of a common complement receptor 2 haplotype with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3961-3966.
136. Wu J., Edberg J.C., Redecha P.B., Bansal V., Guyre P.M., Coleman K., Salmon J.E. and Kimberly R.P. (1997). A novel polymorphism of Fc γ RIIIa (CD 16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* 100, 1059-1070.
137. Xin H., D' Souza S., Jorgensen T.N., Vaughan A.T., Lengyel P., Kotzin B.L. and Choubey D. (2006). Increased expression of Ifi202, an IFN-activatable gene, in B6.Nba2 lupus susceptible mice inhibits p53-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 176, 5863-5870.
138. Xiu Y., Nakamura K., Abe M., Li N., Wen X.S., Jiang Y., Zhang D., Tsurui

- H., Matsuoka S., Hamano Y., Fujii H., Ono M., Takai T., Shimokawa T., Ra C., Shirai T. and Hirose S. (2005). Transcriptional regulation of Fcgr2b gene by polymorphic promoter region and its contribution to humoral immune responses. *J. Immunol.* 169, 4340-4346.
139. Yacoub Wasef S.Z. (2004). Gender differences in systemic lupus erythematosus. *Gend. Med.* 1, 12-17.
140. Yoshida H., Kohno A., Ohta K., Hirose S., Maruyama N. and Shirai T. (1981). Genetic studies of autoimmunity in New Zealand mice. III. Associations among anti-DNA antibodies, NTA, and renal disease in (NZB x NZW)F1 x NZW backcross mice. *J. Immunol.* 127, 433-437.
141. Zandman-Goddard G., Peeva E. and Shoenfeld Y. (2007). Gender and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 6, 366-372.
142. Zinn A.R., Tonk V.S., Chen Z., Flejter W.L., Gardner H.A., Guerra R., Kushner H., Schwartz S., Sybert V.P., Van Dyke D.L. and Ross J.L. (1998). Evidence for a Turner syndrome locus or loci at Xp11.2-p22.1. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 1757-66.

Research on autoimmune glomerulonephritis model mouse

– Candidate gene on the telomeric region of chromosome 1 derived from MRL/MpJ –

Osamu ICHII

Laboratory of Anatomy

Department of Biomedical Sciences

Graduate School of Veterinary Medicine

Hokkaido University

Autoimmune glomerulonephritis, a complication of systemic autoimmune disease, is caused by renal glomerular deposition of immune complexes circulating through the body. Previous studies have reported that the telomeric region of chromosome 1 in some disease model mice contains several loci that are associated with autoimmune glomerulonephritis susceptibility. However, it is unclear whether these loci originated from the same genes. In order to detect autoimmune glomerulonephritis at an early stage and provide subsequent therapy, it is essential to identify the candidate genes and aggravating factors of this disease. In this study, we created an MRL/MpJ-type congenic mouse that carries the telomeric region of chromosome 1 and is susceptible to autoimmune disease. We confirmed the application of this congenic strain in autoimmune glomerulonephritis models, pathology analyses, and the search for candidate genes or aggravating factors of this disease.

We created an MRL/MpJ-type congenic mouse (B6.MRLc1) which was homozygous in

the telomeric region of chromosome 1 (82-100 cM) [B6.MRLc1(82-100)] by applying serial backcrosses between C57BL/6 and (C57BL/6 $\times$ MRL/MpJ)F1. The B6.MRLc1(82-100) mice showed mild glomerular damage from 6 months of age. Their glomerular basement membranes were hypertrophic and contained IgG depositions. Glomerular damage in the B6.MRLc1(82-100) mice was more severe in the females; their glomerulus deteriorated with age. Furthermore, splenomegaly, which occurs due to proliferation of CD3⁺ or B220⁺ cells, was observed in the spleen of the B6.MRLc1(82-100) mice. Serum levels of blood urea nitrogen (BUN) and the anti-double strand DNA (dsDNA) antibody in the B6.MRLc1(82-100) mice were found to have increased with age and were also significantly higher than those of C57BL/6 at 6 months of age. From these findings, it became evident that the B6.MRLc1(82-100) mice had developed autoimmune glomerulonephritis and the candidate gene derived from MRL/MpJ was localized on chromosome 1 (82-100 cM).

We named the loci in the B6.MRLc1(82-100) strain associated with autoimmune glomerulonephritis susceptibility “*Mag*” (*MRL autoimmune glomerulonephritis*). In order to reduce the number of regions of these loci, we produced 3 new B6.MRLc1 strains, namely, B6.MRLc1(82-86), B6.MRLc1(92-100), and B6.MRLc1(100), and assessed their pathology. Of these 3 strains, only the B6.MRLc1(92-100) strain showed glomerular damage with immune complex deposition in addition to elevated spleen weights, serum BUN and anti-dsDNA antibody concentrations, and urinary albumin excretions. These results confirm the localization of autoimmune glomerulonephritis candidate genes on chromosome 1 (92-100 cM).

For the selection of the candidate gene, relative mRNA expression levels of *Crp*

(*pentraxin-related C-reactive protein*), *Apcs* (*serum amyloid P-component*), *Fcgr2b* (*low-affinity Fc receptor for IgG IIB*), and *Fcgr3*, which are major immune-associated genes present in chromosome 1 (92-100 cM), were analyzed in the major organs. A high expression of *Fcgr3* and an elevated *Fcgr3/Fcgr2b* ratio were observed in the kidney, spleen, and thymus of the B6.MRLc1(92-100) strain. Both the inhibitory and active Fc gamma receptors coded by *Fcgr2b* and *Fcgr3*, namely, Fc γ RIIB and Fc γ RIII, respectively, were localized on glomerular mesangial regions and dendritic cells in the lymphoid organs. The Fc γ RIII expressions of the B6.MRLc1(92-100) strains in these regions were stronger than those of C57BL/6. From these findings, the inhibitory and active Fc γ R genes were considered to be candidate genes. It was strongly suggested that the imbalance between those genes had a great impact on the pathogenesis of autoimmune glomerulonephritis.

Female mice showed a higher incidence of systemic lupus erythematosus (SLE), which is the most common autoimmune disease. Further, similar sex-related differences were observed in the B6.MRLc1(82-100) strain; glomerulonephritis was more severe in the female mice than in the male mice. Since sex hormones were considered to be one of the many definitive factors responsible for these sex-related differences, we castrated sex organs of both sexes of the B6.MRLc1(82-100) strain and assessed the effects of gonadectomy in inducing autoimmune glomerulonephritis. In sham operated groups, the female mice showed significantly higher values than the male mice with regard to the glomerular damage scores, the percentage of IgG- and CD3-positive glomerulus, the spleen weights, and the serum levels of total IgG and anti-dsDNA antibodies. The effects of gonadectomy in the

male mice were more apparent than those in the female mice. The male gonadectomy group showed significantly higher values than the male sham operated group with regard to the glomerular damage scores, the percentage of IgG- and CD3-positive glomerulus, the urinary albumin excretions, the spleen weights, and the CD3-positive areas in the spleen. Interestingly, CD3-positive cells were observed in both the thymic cortex and the thymic medulla, in all animals except the males in the sham operated groups. On analysis of the active *Fcgr3/Fcgr2b* ratio in the kidney, the male gonadectomy groups and the female sham operated groups were found to have significantly higher values of the active *Fcgr3/Fcgr2b* ratio than the male sham operated groups. These results suggested that the pathological sex-related differences in autoimmune glomerulonephritis were strongly affected by the inhibitory roles of male sex hormones.

The elevated levels of expression of inflammatory cytokines, chemokines, and their receptors were recently clarified by the array analysis using humor or biopsy samples from patients. These factors are attracting researchers as the targets for disease controls. We attempted to identify the aggravating factors for autoimmune glomerulonephritis in the B6.MRLc1(82-100) strain by studying the expressions of inflammatory mediators by comprehensive PCR array analysis. In the kidney of the B6.MRLc1(82-100) strain, several genes of chemokine ligands and their receptors showed remarkably high expression levels. The expressions of the *Cxcl5* gene [chemokine (C-X-C motif) ligand 5] in the B6.MRLc1(82-100) strain were 72-fold higher than those in C57BL/6; the expressions of this gene increased over time in the B6.MRLc1(82-100) strain. The CXCL5 protein coded by the *Cxcl5* gene

was mainly localized on glomerular podocytes.

In contrast, the gene that showed the highest expression in the kidney of the B6.MRLc1(82-100) strain was *Il1f6* (Interleukin 1 family member 6), which is a member of the IL-1 family; these expressions were 186-fold higher than those of C57BL/6. Furthermore, *Il1f6* gene expressions increased over time in the kidneys of the B6.MRLc1(82-100) strains. The expressions of the *Il1f6* gene and its protein were observed in the kidneys from the distal tubules to the collecting ducts. The dilated tubules in the kidneys of the B6.MRLc1(82-100) strains, in particular, showed a higher level of expression of this protein. Interestingly, the number of renal tubules containing the IL-1F6 protein was in proportion to the number of renal tubules containing protein casts as indices for proteinuria. These results suggest that the *Cxcl5* and *Il1f6* genes, which were highly expressed in the kidney of the B6.MRLc1(82-100) strain, play important roles as aggravating factors of glomerular damage and tubulointerstitial lesions.

Thus, by research on disease model mice, it was concluded that the quantitative changes in candidate genes derived from mouse genome, sex hormones, and local aggravating factors in mouse kidney were closely related to the pathogenesis of autoimmune glomerulonephritis. These findings will provide fundamental knowledge that will enable early diagnosis and subsequent therapy of autoimmune glomerulonephritis in the fields of medicine and veterinary science.