

自己免疫性慢性糸球体腎炎に対する
Spleen tyrosine kinase 阻害薬の効果
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程

内科系内分泌代謝内科学専攻

北井 真貴

2014 年

指導教員 相馬 正義

【目的】

ループス腎炎に代表される自己免疫性の慢性糸球体腎炎は多様な因子が関連する難治性の疾患であり、治療はステロイド療法が第一選択である。しかしながらステロイド療法は副作用が多く、奏効しない例もあり、新たな治療法の開発が待たれている¹⁻³。近年 Fc 受容体 γ 鎖(FcR γ)が自己免疫性の慢性糸球体腎炎において重要な役割を担うことが知られてきている⁴。自然発症型全身性エリテマトーデス(SLE)モデルマウスである NZB \times NZW F1 マウス(NZB /W F1 マウス)と FcR γ (-/-)とを戻し交配したマウスにおいて、抗 DNA 抗体などの産生や糸球体への免疫複合体の沈着は認められたが、ループス腎炎の発症は完全に抑制されたという報告がされている⁵⁻⁷。FcR γ のシグナル伝達物質として spleen tyrosin kinase(Syk)が関与していることが示唆されている。Syk はリン酸化により immunoreceptor tyrosine-based activation motife(ITAM)に結合し、架橋化により活性化され、その活性化シグナルは SH3 domain binding protein 2(3BP2)などにより、エフェクタータンパク質に伝達される⁸⁻¹⁰。最近の研究で Syk の伝達を阻害することにより、慢性関節リウマチのモデルマウスに置いてその症状の改善を認めたという報告がされている¹¹。本研究では自己免疫性の糸球体腎炎において重要な役割を持つ Fc 受容体 γ 鎖において、そのシグナル伝達を担う Syk をターゲットとし、その阻害薬を用いて Fc 受容体 γ 鎖の機能を抑制し、自己免疫性の糸球体腎炎の治療薬としての可能性を検討する。

【対象と方法】

NZB/W F1 マウス(雄、16 週齢)に対して Syk 阻害薬(R406, ChemScene,LLC)を 0.5%メチルセルロース懸濁し 5mg/kg の濃度で経口投与を行った。期間は 20 週間、週 6 日、1 日 2 回の投与を行った。コントロール群には 0.5%メチルセルロースを経口投与した。20 週後 (36 週齢) に心臓採血を行い、腎臓、脾臓の摘出を行った。

【結果】

NZB/W F1 マウスへの Syk 阻害薬の経口投与の効果

NZB/W F1 マウスは自己免疫性慢性糸球体腎炎モデルマウスであり、コントロール群では 32 週齢より尿蛋白が出現した。Syk 阻害薬である R406 を 5mg/kg にて 20 週間経口投与した群ではその発症は抑制され 35 週齢で尿蛋白の出現が見られたものの、この時点でも尿蛋白は有意に抑制されていた。またコントロール群では 36 週齢において腎障害による血清クレアチニンの有意な上昇を認めたが、R406 投与群では有意に抑制していた。

腎臓組織の HE、PAS 染色および免疫染色

HE 染色により NZB/W F1 マウスは 36 週齢において糸球体の著明な硬化と分葉化を認め、PAS 染色でメサングウム細胞の増殖を認めた。また HE および PAS 染色により間質への好酸球の浸潤を認めた。尿細管には明らかな変化は見られなかった。これらの病理組織学的な変化は R406 投与群では抑制されていた。さらに免疫染色では、NZB/W F1 マウスは 36 週齢において糸球体メサングウム領域を中心に IgG、C3 の沈着を認めたが、R406 投与群では群で沈着が抑制されていた。

Syk 阻害薬の MCP-1、TGF- β 、Endthelin-1 mRNA に対する影響

腎臓組織から mRNA を抽出し、MCP-1、TGF- β 、Endthelin-1mRNA 発現を real time RCR で検討した。R406 投与群ではコントロール群に比べて、MCP-1、TGF- β 、Endthelin-1 の mRNA が有意に抑制されていた。

Syk 阻害薬のネフリン、ポドシン、mRNA への影響

腎臓組織ネフリン、ポドシン mRNA 発現を real time RCR で検討した。R406 投与群ではコントロール群に比べて、ネフリン mRNA は有意に抑制されていた。ポドシン mRNA も R406 群でコントロール群と比べ低下傾向は認めたが有意差は認めなかった。

Syk 阻害薬のネフリン、ポドシン、タンパクへの影響

腎臓組織からタンパクを抽出後 western blotting を行った。ネフリンは R406 群ではコントロール群と比べタンパク量の増加傾向を認めた。ポドシンにおいても R406 群でコントロール群と比べタンパク量の増加を認めた。また、腎臓組織の免疫染色を行いネフリン、ポドシンの発現を検討したところ、ネフリンポドシン共にコントロール群と比べ R406 群において良好な染色性を認め、western blotting と同様の傾向であった。

Syk 阻害薬の 3BP2 のリン酸化への影響

3BP2 は Syk によりリン酸化されエフェクタータンパクへシグナルを伝える、このため 3BP2 のリン酸化について検討した。脾臓組織から抽出し白血球よりタンパクを抽出し抗リン酸化抗体を用いて western blotting を行った。コントロール群に比べて、R406 群では脾臓白血球における 3BP2 のリン酸化は抑制されていた。

Syk 阻害薬の FcRn mRNA、タンパクへの影響

R406 投与群では FcRn mRNA、タンパクともにはコントロール群と比べ増加していた。免疫組織学的検討では腎糸球体における FcRn は両群で明らかな差は認められなかった。

Syk 阻害薬の p-38MAPK のリン酸化への影響

FcRn は p38MAPK を介してポドサイト傷害を引き起こすと考えられている。そのためタンパク中の p-38MAPK のリン酸化について検討した。腎臓組織からタンパク抽出し、抗リン酸化抗体を用いて western blotting を行った。コントロール群に比べて、R406 群で p-38MAPK のリン酸化は抑制されていた。

【考察】

Fc 受容体 γ 鎖は自己免疫性の慢性糸球体腎炎の発症に重要な役割を果たすと考えられている⁴。本研究では Fc 受容体 γ 鎖のシグナル伝達分子として注目される Syk を阻

害することで腎炎の発症を防ぎ、その機序を検討した。

Fc 受容体にリガンドが結合すると ITAM と呼ばれるチロシン残基を 2 つ含むモチーフにチロシンキナーゼである Lyn が活性化を受けて結合する^{12, 13}。Lyn が γ サブユニットの ITAM をリン酸化し、その部位にチロシンキナーゼである Syk が引き寄せられてリン酸化を受け、活性化される¹⁴。Syk はこれより下流の様々な経路を活性化してゆく。我々は NZB/W F1 マウスに Syk の阻害剤である R406 を経口投与してその効果を検討した。NZB/W F1 マウスに対する 5mg/kg、20 週間の経口投与により、尿蛋白の出現を遅らせ、血清クレアチニンの上昇を抑制し、さらに組織学的変化も抑制していた。FcR γ は Fc γ 受容体 I および III の共通のサブユニットであり、Fc γ 受容体 I および III はループス腎炎の病態に関わることが報告されている。R406 はその両者を抑制することで自己免疫性慢性糸球体腎炎の病態を制御できるとことが可能であることを示している。

腎障害における尿蛋白の出現には糸球体上皮細胞であるポドサイトの足突起の消失が大きく関与している。中でもネフリンやポドシンはスリット膜の構造、機能維持に重要な役割を果たしており、ネフローゼ症候群を呈する糸球体腎炎では共にタンパクレベルにおいて低下する事が明らかとされている¹⁵。本研究でもコントロール群に比べて R406 投与群ではネフリン、ポドシンの低下は抑制されており、ポドサイトの障害の改善作用を示していた。

3BP2 は主に B 細胞に発現し、Syk によってリン酸化されることでその活性化シグナルをエフェクタータンパク質に伝達すると考えられる。本研究において脾臓組織から抽出した白血球で 3BP2 のリン酸化を検討したところ、R406 投与群ではコントロール群に比べて 3BP2 のリン酸化は抑制されており、Syk 阻害は 3BP2 のリン酸化抑制を介して、その下流へのシグナル伝達を阻害し、腎炎の発症が抑制したと考えられる。

また近年 FcRn とポドサイト障害のとの関連が示唆されてきた¹⁶。糸球体腎炎におい

て FcRn は糸球体内で増加し、p-38MAPK のリン酸化を介して、UCHL-1 が増加することでポドサイト傷害を起こすと報告されている¹⁷。FcRn の mRNA については、R406 投与群と比べてコントロール群で低下傾向であったが、有意差は認めず、タンパクについてもコントロール群で低下傾向であったが、有意な差は認めなかった。このことから Syk の阻害により FcRn の発現には影響を及ぼさないと考えられた。ところが、p38 MAPK のリン酸化について検討したところ、R406 投与群では、コントロール群に比べて p38 MAPK のリン酸化が抑制されていた。Syk の阻害により FcRn には有意な変化を認めなかったことから、NZB/W F1 マウスで起こっている p38MAPK の活性化は FcRn を介さない系で起こっているか、または FcRn から p38 MAPK へのシグナル伝達の際に Syk の影響を受ける伝達物質が存在すると考えられた。

今回 Syk 阻害薬の投与により、Syk からの 3BP2 や p38MAPK のリン酸化を抑止し、Fc 受容体からのシグナル伝達を阻害することで、自己免疫性糸球体腎炎の発症が抑制される可能性が示された。今後さらなる機序の検討を行い、臨床への応用を検証していく必要があると考えられる。

【まとめ】

Fc 受容体のシグナル伝達を伝える分子として重要な役割を担う Syk を阻害し、その効果と機序を検討した。自己免疫性の慢性糸球体腎炎における Fc γ 受容体 I 及び III の重要性とその病態に影響する機序を明らかにし、本疾患の新しい治療薬としての可能性が示された。

引用文献

1. Bagavant H, Fu SM. Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematosus. *Current opinion in rheumatology*. 2009; **21**(5): 489-94.
2. Couser WG. Pathogenesis of glomerulonephritis. *Kidney international Supplement*. 1993; **42**: S19-26.
3. Couser WG. Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1998; **13 Suppl 1**: 10-5.
4. Gohda T, Ra C, Hamada C, Tsuge T, Kawachi H, Tomino Y. Suppressive activity of pemirolast potassium, an antiallergic drug, on glomerulonephritis. *Studies in glomerulonephritis model rats and in patients with chronic glomerulonephritis concurrently affected by allergic rhinitis. Arzneimittel-Forschung*. 2008; **58**(1): 18-23.
5. Clynes R, Dumitru C, Ravetch JV. Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science*. 1998; **279**(5353): 1052-4.
6. Lin Q, Xiu Y, Jiang Y, Tsurui H, Nakamura K, Kodera S, et al. Genetic dissection of the effects of stimulatory and inhibitory IgG Fc receptors on murine lupus. *Journal of immunology*. 2006; **177**(3): 1646-54.
7. Watson SP, Gibbins J. Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immunology today*. 1998; **19**(6): 260-4.
8. Kaur M, Singh M, Silakari O. Inhibitors of switch kinase 'spleen tyrosine kinase' in inflammation and immune-mediated disorders: A review. *European journal of medicinal chemistry*. 2013; **67**: 434-46.
9. Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, et al. The

Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *The EMBO journal*. 1997; **16**(9): 2333-41.

10. Shukla U, Hatani T, Nakashima K, Ogi K, Sada K. Tyrosine phosphorylation of 3BP2 regulates B cell receptor-mediated activation of NFAT. *The Journal of biological chemistry*. 2009; **284**(49): 33719-28.

11. Podolanczuk A, Lazarus AH, Crow AR, Grossbard E, Bussel JB. Of mice and men: an open-label pilot study for treatment of immune thrombocytopenic purpura by an inhibitor of Syk. *Blood*. 2009; **113**(14): 3154-60.

12. DeFranco AL, Richards JD, Blum JH, Stevens TL, Law DA, Chan VW, et al. Signal transduction by the B-cell antigen receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1995; **766**: 195-201.

13. van der Poel CE, Spaapen RM, van de Winkel JG, Leusen JH. Functional characteristics of the high affinity IgG receptor, FcγRI. *Journal of immunology*. 2011; **186**(5): 2699-704.

14. Siraganian RP. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Current opinion in immunology*. 2003; **15**(6): 639-46.

15. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2003; **14**(8): 2063-71.

16. Kuo TT, Aveson VG. Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics. *mAbs*. 2011; **3**(5): 422-30.

17. Gan H, Feng S, Wu H, Sun Y, Hu R, Zhao Z, et al. Neonatal Fc receptor stimulation induces ubiquitin c-terminal hydrolase-1 overexpression in podocytes through activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Human pathology*. 2012; **43**(9): 1482-90.