

LPS, IL-13 による腎糸球体上皮細胞傷害と
リツキシマブの作用についての研究
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系小児科学専攻

高橋 悠乃

修了年 2018 年

指導教員 高橋 昌里

背景

特発性ネフローゼ症候群は幼少期に好発する高度蛋白尿と低蛋白血症を伴う疾患である。小児におけるネフローゼ症候群の中で最も頻度が高いが、いまだに原因はわかっていない。標準治療はステロイド薬であり、ステロイド感受性のものは腎生検による腎組織所見でほとんど変化の無い微小変化型ネフローゼ症候群 (Minimal change nephrotic syndrome; 以下 MCNS) であることが多く、ステロイド抵抗性のものに巣状糸球体硬化症 (Focal segmental glomerular sclerosis ; 以下 FSGS) の組織像をとる症例が多く含まれる。ステロイド感受性であっても 40% 近くが頻回に再発するため、ステロイド薬の長期大量投与による成長障害、易感染性をはじめとした副作用が問題となる¹⁾。近年、既存治療に抵抗性で難治症例に対してヒト・マウスキメラ型の抗 CD20 モノクローナル抗体 (rituximab : 以下 RTX) が保険収載され多くの症例が寛解を維持できるようになった。MCNS の病態を形成する主要因である腎糸球体上皮細胞 (以下ポドサイト) には CD20 が発現しておらず、RTX の off-target として Sphingomyelin phosphodiesterase acid like 3B (以下 SMPDL3B) が報告されたが²⁾、ポドサイトへの直接的な作用機序は不明な点が多い。

目的

本研究では、培養ヒト腎系球体上皮細胞（以下培養ポドサイト）に対して、ポドサイト傷害を誘導する物質として普遍的に使用される大腸菌由来の Lipopolysaccharide（以下 LPS）と特発性ネフローゼ症候群患者の血清中で上昇する Interleukin-13（以下 IL-13）による培養ポドサイトの細胞傷害と RTX の効果について検討した。

対象と方法

ヒトの腎組織から樹立された条件的不死化培養ヒト腎系球体上皮細胞株³⁾を用いて以下の検討を行った。

1. 未分化条件（33 °C、5% CO₂ 増殖期）と分化条件（37 °C、5% CO₂ 非増殖期）でのマイクロアレイ解析を行いポドサイト分化マーカーの発現を確認した。
2. 蛍光免疫染色法によりポドサイトの分化マーカー発現を確認した。
3. LPS, IL-13 によるポドサイト細胞生存率と RTX による影響を検討した。
4. LPS, IL-13 によるアポトーシス誘導と RTX の影響を検討した。
5. F-actin と核の蛍光免疫染色により、LPS, IL-13 のストレスファイバー形成の変化と RTX による影響を Cortical-F-actin score index を用いて

評価した。

6. LPS, IL-13 による SMPDL3B の RNA 発現変化と RTX の影響を Real Time PCR 法を用いて検討した。
7. LPS, IL-13 による培養ポドサイトの形態変化について倒立顕微鏡を用いてタイムラプス撮影により検討した。

結果

1. 分化培養ポドサイトにおいて、ポドサイト分化マーカーである Podocin, Synaptopodin, CD2AP の RNA レベルでの発現を確認した。
2. 蛍光免疫染色法でも同様にポドサイト分化マーカーである Podocin, Synaptopodin, CD2AP の発現を確認した。
3. LPS により細胞生存率は濃度依存性に低下する傾向があり、IL-13 では変化がみられなかった。RTX の併用により細胞生存率が有意に低下した。
4. LPS, IL-13 濃度依存性にアポトーシスが誘導される傾向にあったが有意差はなく、RTX や比較対照として用いた IgG の添加で有意にアポトーシスが誘導された。
5. LPS, IL-13 により細胞骨格のリモデリングが生じ、RTX で改善する

傾向にあった。

6. LPS, IL-13 により SMPDL3B の遺伝子発現は有意に低下し、RTX により改善した。
7. 培養ポドサイトは運動性が高く、IL-13 添加でポドサイトの取り込み像がみられた。

結論と考察

ポドサイトは糸球体における濾過障壁の重要な役割を担っている細胞であり、基底膜と血管内皮細胞とのクロスリンク作用で定常状態ではタンパクの過度な漏出を防いでいる。ネフローゼ症候群ではポドサイトの足突起癒合が観察され、細胞骨格のリモデリングや肥大、脱落、アポトーシスなどの障害が生じている⁴⁾。

したがって、ポドサイト傷害と新規治療薬である RTX による効果を解析する事でネフローゼ症候群の病態を明らかにできる可能性がある。

私は、本研究において CD20 を発現していないポドサイトに抗 CD20 抗体である RTX がどのように作用しているのかという疑問を解決するため、ポドサイト傷害を来たす物質として普遍的に使用されている大腸菌由来の LPS と、微小変化型ネフローゼ症候群で上昇している IL-13 を用いてヒト

培養ポドサイトに対する細胞生存率やアポトーシス誘導、細胞骨格リモデリングや形態学的変化を解析しそれぞれに対する RTX の効果を検討し、LPS による培養ポドサイト傷害（細胞生存率の低下、アポトーシス誘導）が RTX により増強され、IL-13 による細胞骨格リモデリングが RTX により修復し、ダイナミックな形態変化を来すという結果を得た。

最初に、LPS によるポドサイト傷害についてはアポトーシスの誘導⁵⁾や Cdc42/Rac1 の活性化を伴う細胞骨格の変化⁶⁾、細胞増殖や遊走、炎症の誘導⁷⁾が、IL-13 によるポドサイト傷害については LPS と同様に Rac1 活性上昇を伴う細胞骨格の変化や⁸⁾ポドサイト特異蛋白の低下⁹⁾が報告されており、本研究では細胞生存率とアポトーシス誘導、細胞骨格リモデリングについて検討した。

LPS により細胞生存率は濃度依存性に低下、アポトーシスは増強する傾向にあった。IL-13 添加では、細胞生存率やアポトーシスの変化はなく、細胞骨格リモデリングが生じた。細胞骨格はポドサイトと周囲への接着やスリット膜形成などポドサイトの恒常性を保つために非常に重要な機構であると同時に、ポドサイトの遊走や、後述する細胞同士の Entosis においてもダイナミックな変化が要求される¹⁰⁾。したがって、この知見はポドサイト機能障害を解析するうえで意味のある変化であると考えらる。

次に、ネフローゼ症候群に対して寛解維持に貢献し、ポドサイトに対して保護的な作用があると考えられている RTX の効果を検討した。

予想に反して RTX は LPS や IL-13 添加によるポドサイト生存率を抑制し、アポトーシスを誘導する結果となった。IL-13 による細胞骨格のリモデリングは RTX 添加により改善した。また、比較対照として用いた IgG 添加でもアポトーシスの誘導が観察された。一方、RTX の標的蛋白である SMPDL3B の RNA レベルでの発現は LPS, IL-13 添加により有意に減少し、RTX により reverse した。さらに、形態学的には IL-13 添加後に剥離した培養ポドサイトが隣接する細胞にとりこまれ、24 時間後には消失する現象がみられた。第一に RTX によりポドサイトのアポトーシスが誘導され細胞骨格リモデリングが修復されたこと、第二に何らかの傷害を受けたポドサイトが隣接するポドサイトに貪食され消滅したことから RTX と SMPDL3B はアポトーシスを誘導、細胞骨格維持に関与し、ポドサイトには変性した自己細胞を処理する機構が備わっている可能性が示唆された。先述したように RTX の CD20 以外の off-target として SMPDL3B が報告されている。

SMPDL3B はスフィンゴミエリンをセラミドに加水分解する酸性スフィンゴミエリナーゼ活性を持つ。培養ポドサイトに放射線照射をすると SMPDL3B 発現は蛋白レベルで低下し、セラミド産生が上昇、セラミドの

代謝産物であるスフィンゴシンとスフィンゴシン-1-リン酸の産生が低下すると報告されている^{1 1)}。再発 FSGS 患者の血清添加ポドサイトでみられるアポトーシスの増強と酸性スフィンゴミエリナーゼ活性の低下は RTX により改善するという報告もある^{1 2)}。RTX は SMPDL3B の発現を増強させる。それによって産生されるセラミドとセラミドの代謝産物であるスフィンゴシン-1-リン酸のバランスによって細胞の生死が運命づけられると報告されており^{1 3)} RTX による SMPDL3B の発現増強が直接セラミド代謝に関与しアポトーシスや細胞生存率に影響している可能性が示唆された。

また、変性ポドサイトを隣接するポドサイトが取り込み消滅させるダイナミックな形態学的変化が観察された。

ポドサイトの細胞死に関しては細胞周期異常、アポトーシス、オートファジー、ネクローシス、Entosis などが考えられているが^{1 4)}、Entosis に関する報告は検索し得る限り見当たらない。Entosis は有糸分裂などのシグナルによって異常な増殖や変性をした細胞に対して隣接する細胞が取り込む、“細胞の共喰い”とよばれる自己修復機構のひとつである^{1 5)}。IL-13 単独では有意なアポトーシスは誘導されなかったことと、対照群の観察で一度剥離したと思われる培養ポドサイトが再び接着する様子が観察された事から、この現象は Podocyte の Entosis をみている可能性が示唆された。

本研究の限界として、*In vitro* の実験である事とポドサイト傷害に関わる詳細な経路の解析を行っていない事、RTX 単独群の検討、SMPDL3B 発現抑制や発現増加の検討が不十分である事があげられる。セラミドの代謝産物であるスフィンゴシン-1-リン酸は多発性硬化症や自己免疫疾患、アレルギー性疾患、癌をはじめ敗血症など多数の分野で生体内での動向が病態に大きく関わりとされているリゾリン脂質の一種である^{16)~20)}。今年に入ってこのスフィンゴシン-1-リン酸をグリセロリン脂質へと分解する経路の唯一の酵素である S1P Lyase 遺伝子異常が先天性ネフローゼ症候群の新たな原因遺伝子として相次いで報告された^{21)~23)}。SMPDL3B だけでなく、その代謝経路に関わるセラミドやスフィンゴシン-1-リン酸、S1P Lyase のポドサイトに対する影響を検討する事で、新たな治療標的になる可能性が示唆される。

引用文献

1. 高橋悠乃, 高橋昌里 (2015). "小児ネフローゼ症候群の免疫学的背景."
日大医学雑誌 74(3): 87-94.
2. Perosa, F., et al. (2006). "Generation of biologically active linear and cyclic peptides has revealed a unique fine specificity of rituximab and its possible cross-reactivity with acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b precursor." *Blood* 107(3): 1070-1077.
3. Saleem, M. A., et al. (2002). "A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression." *Journal of the American Society of Nephrology* 13(3): 630-638.
4. Nagata, M. (2016). "Podocyte injury and its consequences." *Kidney international* 89(6): 1221-1230.
5. Saurus, P., et al. (2015). "Podocyte apoptosis is prevented by blocking the Toll-like receptor pathway." *Cell death & disease* 6(5): e1752.
6. Mashmoushi, A. K. and J. C. Oates (2015). "Lipopolysaccharide induces inducible nitric oxide synthase-dependent podocyte dysfunction via a hypoxia-inducible factor 1 α and cell division control protein 42 and Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 pathway."

Free Radical Biology and Medicine 84: 185-195.

7. Srivastava, T., et al. (2013). "LPS and PAN-induced podocyte injury in an in vitro model of minimal change disease: changes in TLR profile." *Journal of cell communication and signaling* 7(1): 49-60.
8. Chan, C.-Y., et al. (2016). "Novel role of Vav1-Rac1 pathway in actin cytoskeleton regulation in interleukin-13-induced minimal change-like nephropathy." *Clinical Science* 130(24): 2317-2327.
9. Ha, T.-S., et al. (2017). "Montelukast improves the changes of cytoskeletal and adaptor proteins of human podocytes by interleukin-13." *Inflammation Research* 66(9): 793-802.
10. Sun, Q., et al. (2014). "Induction of entosis by epithelial cadherin expression." *Cell research* 24(11): 1288-1298.
11. Ahmad, A., et al. (2017). "Sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b mediates radiation-induced damage of renal podocytes." *The FASEB Journal* 31(2): 771-780.
12. Fornoni, A., et al. (2011). "Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis." *Science translational medicine* 3(85): 85ra46.

13. Taha, T. A., et al. (2006). "A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758 (12), 2027-2036.
14. Tharaux, P.-L. and T. B. Huber (2012). "How many ways can a podocyte die?" *Seminars in nephrology*, 32 (4), 394-404.
15. Durgan, J., et al. (2017). "Mitosis can drive cell cannibalism through entosis." *eLife* 6. e27134, 1-26.
16. Baumruker, T., et al. (2007). "FTY720, an immunomodulatory sphingolipid mimetic: translation of a novel mechanism into clinical benefit in multiple sclerosis." *Expert opinion on investigational drugs* 16(3): 283-289.
17. Watson, L., et al. (2012). "Increased serum concentration of sphingosine-1-phosphate in juvenile-onset systemic lupus erythematosus." *Journal of clinical immunology* 32(5): 1019-1025.
18. Lai, W.-Q., et al. (2011). "Sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate in asthma." *Bioscience reports* 31(2): 145-150.
19. McCracken, A. N., et al. (2017). "Phosphorylation of a constrained azacyclic FTY720 analog enhances anti-leukemic activity without

inducing S1P receptor activation." *Leukemia* 31(3): 669-677.

20. Winkler, M. S., et al. (2017). "Sphingosine-1-Phosphate: A Potential Biomarker and Therapeutic Target for Endothelial Dysfunction and Sepsis?" *Shock* 47(6): 666-672.

21. Janecke, A. R., et al. (2017). "Deficiency of the sphingosine - 1 - phosphate lyase SGPL1 is associated with congenital nephrotic syndrome and congenital adrenal calcifications." *Human Mutation* 38(4): 365-372.

22. Lovric, S., et al. (2017). "Mutations in sphingosine-1-phosphate lyase cause nephrosis with ichthyosis and adrenal insufficiency." *The Journal of clinical investigation* 127(3): 912-928.

23. Prasad, R., et al. (2017). "Sphingosine-1-phosphate lyase mutations cause primary adrenal insufficiency and steroid-resistant nephrotic syndrome." *The Journal of clinical investigation* 127(3): 942-953.