

膜性腎症モデルマウスの確立-難治性ネフローゼ症候群の機序解明へ

京都大学大学院医学研究科 分子生体制御学講座医化学分野

安田 圭子

1. 諸言

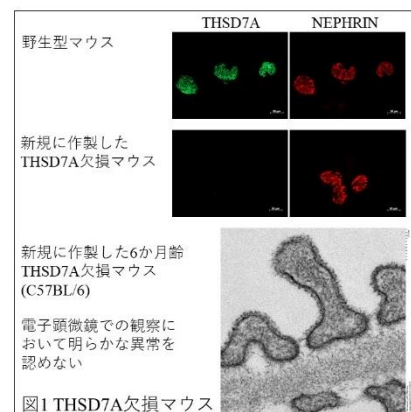
膜性腎症 (membranous nephropathy: MN) は、成人ネフローゼ症候群の中で最も頻度が高く、そのうち 40~50%が難治性であり、末期腎不全の原因となる。MN の治療として、ステロイドや免疫抑制剤が用いられるが、疾患に特異的な治療ではなく、長期に内服を要する 경우가多いことから、骨粗鬆症やうつなどの副作用が問題となっている。昨年、リツキシマブ投与がシクロスポリン投与よりも治療成績が優れていると報告されたが、それでも 24 か月時点での完全寛解・部分寛解率は 60%であったことから¹⁾、病態機序の解明および疾患特異的な治療法の確立が強く望まれており、疾患マウスモデルの確立が急務である。

長らく特発性とされていた MN の原因抗原として PLA2R²⁾が最初に報告されたのを皮切りに、THSD7A³⁾、EXT1/EXT2⁴⁾、NELL-1⁵⁾、Semaphorin3B⁶⁾、HTRA1⁷⁾と、これまでに 6 つが報告されている。しかしながら、最も頻度として高い PLA2R はマウスでは人と発現部位が異なり、ポドサイトではなくメサンギウム細胞で発現しているため、マウスモデルの確立は困難で、持続的な蛋白尿を認める系の作成に成功していない⁸⁾。一方、THSD7A に関しては、抗 THSD7A 自己抗体含有の患者血清をマウスに投与すると蛋白尿を惹起した⁹⁾こと、THSD7A はヒトと同様にマウスのポドサイトに発現している¹⁰⁾ことから、マウスモデル作製に有用な可能性が高いと考えられるものの、現時点では THSD7A 欠損マウスの報告がなく、生体内での THSD7A の機能が明らかでない。加えて、疾患マウスモデルの作製にも成功していない。そこで、病態機序の解明、疾患特異的な治療ターゲットの検索を目的として、THSD7A を基軸としたマウスモデルの確立を目標として作製を開始した。

2. 方法

2.1 生体内での THSD7A の機能の解明

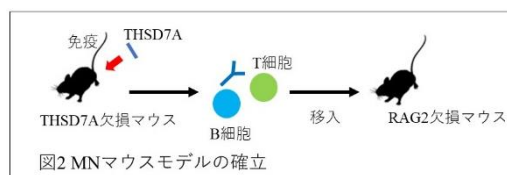
THSD7A は、ポドサイトの足突起基底膜側に発現していることが報告された¹¹⁾が、THSD7A 欠損マウスの表現型を調べた報告はない。予備検討の結果、新規に作製した THSD7A 欠損マウス (C57BL/6) は、6 か月齢の時点で



明らかな腎機能障害および組織学的変化を認めなかった (図 1)。新規に作製した THSD7A 欠損マウスを用いて、腎臓における THSD7A の機能を明らかにすることとした。

2.2 THSD7A 欠損マウスを用いた MN マウスモデルの確立

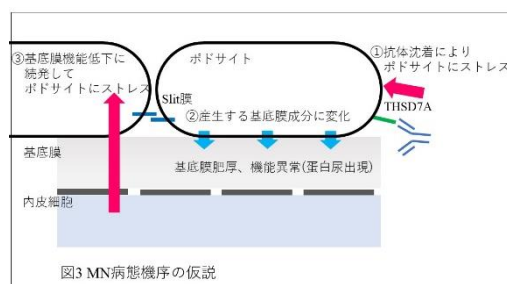
MN 患者での検出抗体は N 末端側をエピトープとする傾向にあるとの報告¹²⁾に基づき、クローニングした THSD7A 全長のうち、N 末端側のドメインを用いてリコンビナント蛋白を作成した。野生型マウスへの免疫では抗体産生を認めなかったことから、THSD7A 欠損マウスに免疫を行うことで抗体を産生する系を構築した。抗体産生を誘導した上で、遺伝的に T 細胞および B 細胞を欠損する RAG2 欠損マウスに T 細胞または B 細胞を単離してそれぞれ移入することで疾患惹起に寄与する責任細胞を同定することとした (図 2)。



2.3 マウスモデルを用いた新規治療薬のターゲットとなる標的因子の検索

まず、MN の病理組織学的変化から、病態機序として

①自己抗体がポドサイトに沈着することでポドサイトに変化②ポドサイトの変化に続発する基底膜成分の産生過剰あるいは基底膜成分の分解の遅延③基底膜の機能が低下することにより、さらなる二次的なポドサイト、メサンギウム細胞への負荷が長期的に腎機能障害をひき起こす。



の順に病態が進行するとの仮説をたてた (図 3)。ヒト MN の腎生検検体基底膜において、成熟基底膜では一般的には認められない laminin β 1 を認めた¹³⁾ことから、障害を受けたポドサイトが定常状態とは異なる基底膜成分を産生し、基底膜の肥厚、機能障害をおこした結果、蛋白尿を引き起こす可能性が示された。まず、2.2 で確立した新規のマウスモデルを使用して laminin、4 型コラーゲンの病理組織染色を行い、基底膜の経時的変化 (②) を明らかにする。次にその上流である①の機序を解明するために、自己抗体沈着後、早期の段階での腎臓糸球体を単離し、RNA-seq により mRNA 発現プロファイルを調べた。特に転写因子に着目し、②の過程での基底膜成分の変化をひき起こす責任因子の同定を目指した。さらに、③の機序を明らかにするために、基底膜の肥厚、高度蛋白尿が持続したマウスでの腎臓糸球体を単離し、これまでに明らかになっているポドサイト障害の因子との関連に着目して、RNA-seq により mRNA 発現プロファイルを調べた。変化を認めた因子の因果関係を明らかにするためにポドサイト初代培養細胞に強制発現系を用いて機能の変化を検証する。最終的には、生体での治療標的になるかどうかを vivo で検証する予定とした。

3.結果

3.1 生体内での THSD7A の機能の解明

上述のように予備検討の結果からは、新規に作製した THSD7A 欠損マウス (C57BL/6) は、6 か月齢の時点で明らかな腎機能障害および組織学的変化を認めなかった (図 1)。さらに 12 か月齢の時点では、電子顕微鏡において基底膜の不整化、肥厚を認めたものの、程度は軽微であり、明らかな腎機能障害を認めず、蛋白尿も明らかではなかった。そのため、次に述べる MN マウスモデルを確立する目的においても、また THSD7A の生体内での機能、とりわけ腎臓での機能を評価する目的においても、糸球体病変に感受性の高いマウス系統を用いる必要があると考えた。現在、既に系統 A での THSD7A 欠損マウスの F8 世代を得ていることから、今後、引き続き予備検討を進めながら、10 世代以上戻し交配を行ったマウスを用いて、腎病変の検証を行い、THSD7A の腎臓での機能を明らかにする予定である。(発現部位からは、ポドサイトと基底膜の接着、構造維持への関与が予想される。)

3.2 THSD7A 欠損マウスを用いた MN マウスモデルの確立

まず、野生型マウスに、作成したリコンビナント THSD7A 蛋白を用いて免疫したが、既報¹⁴⁾と同様に抗体の作成を認めなかった。そのため、1)生体内での THSD7A の機能解明、2)免疫して抗 THSD7A 抗体を作成する 2つの目的で新規に THSD7A 欠損マウスを作製し、ホモの欠損マウスを得た。予備検討としてラット抗マウス THSD7A モノクローナル抗体を作成し、野生型マウスへの抗体投与により蛋白尿を惹起できることを確認したが、蛋白尿の程度が軽微であり、ネフローゼ症候群のマウスモデルとしては病態の程度が不十分であると判断した。その一方で、軽微ではあったものの蛋白尿を認めたことから、ストラテジーには問題がないとの確証を得た。ここで検討を重ねた結果、マウスの実験において広く用いられている C57BL/6 系統のマウスは糸球体病変に対して抵抗性であることから¹⁵⁾、マウス系統 A が持続的な高度蛋白尿を認め、さらに 2 か月以上の経過で腎機能障害に進展したことを踏まえ、系統 A を用いることが望ましいと考えた。上記の THSD7A 欠損マウスが C57BL/6 であることから、系統 A に戻し交配を行う方針とした。これに伴い、当初予定した、THSD7A 欠損マウスを THSD7A 蛋白で免疫し、さらにその T 細胞、B 細胞を RAG2 欠損マウスに移入する系の実験を行う上で、RAG2 欠損マウスに関しても戻し交配を行う必要があることから、このマウスに関しても腎臓の糸球体病変感受性である系統 A に戻し交配を行った。こちらも現在 F8 世代を得ているため、引き続き 10 世代以上の戻し交配を行う予定で進めている。

なお、当初の予定から変更で戻し交配を行う必要があると判断したことから、今後の実験の予備検討を先に行うこととし、リコンビナント THSD7A 蛋白の作成および、リコンビナント THSD7A 蛋白を免疫して、THSD7A 欠損マウスに (抗 THSD7A) 抗体を産生させるプロトコルの確立を行うこととし、抗原とアジュバント投与の量、間隔、回数を含めたプロトコルの条件検討を行った。その結果、(戻し交配中の) THSD7A 欠損マウスを用いて、(抗 THSD7A) 抗体を産生させる系を確立しつつある。

3.3 マウスモデルを用いた新規治療薬のターゲットとなる標的因子の検索

既に述べたように、検討の結果からは、MN マウスモデルの確立にあたっては系統 A への戻し交配が必要と判断し、当初の予定から変更することにしたため、本研究期間中に新規治療薬のターゲットとなる標的因子の検索まで至らなかった。そこで、まず、腎臓から糸球体の組織を 1 細胞レベルで回収、mRNA の発現レベルを解析するための条件検討として、細胞の単離プロトコルの検討を進めることとした。近年、腎臓においても single cell RNA-sequence の文献が多数報告されており、腎臓の糸球体細胞単離に関しても知見が多く得られている¹⁶⁾。目的の細胞としてポドサイト、メサンギウム細胞、血管内皮細胞、上皮細胞をそれぞれ表面蛋白マーカーで標識して、セルソーターで回収し、RNA を抽出して mRNA 発現を全ゲノム網羅的に行うため、単離においては、細胞の viability を保つこと、RNA を分解させないこと、(とりわけマーカーに用いる) 細胞表面蛋白マーカーの発現を保持しながら 1 細胞レベルに単離することが重要となるため、用いる酵素、温度、条件について文献をもとに条件検討を進めた。これらの確立したプロトコルを用いて、今後、当初予定した疾患機序の解明および新規治療薬のターゲットとなる標的因子の検索が可能となる。

4. 考察

日本人における MN の原因抗原として PLA2R は約 50%¹⁷⁾と最も多く、THSD7A は 10%程度である¹⁸⁾が、ポドサイトに自己抗体が沈着した後の病態機序については共通であることが予想されるため、THSD7A に着目したヒト MN マウスモデルの確立は、MN のごく一部の病型を説明するだけでなく、MN 全般の病態機序解明につながるものと期待される。さらに、予備検討において軽微ではあったものの蛋白尿を惹起することを確認したことから、当初の予定に追加で、THSD7A 欠損マウスをさらに系統 A に戻し交配する必要が生じたが、この方法をとることで、現在用いられている慢性腎臓病の 5/6 腎摘マウスモデルと比較しても、より糸球体原発の病態に即した新規のマウスモデルとなることが見込まれ、これまでに明らかにできなかった病態機序の解明を通して新規治療ターゲットの検索が可能になると期待できる。

また、戻し交配が必要であると判断したことを含め、疾患の責任抗原が判明したもののこれまで、疾患マウスモデルの確立が困難であった要因が複数あるものと考えられた。これらの要因を一つずつ解消しながら、引き続き、病態機序の解明および新規治療法の開発を目標に研究を継続する所存である。

5. 結語

MN の原因抗原の一つである THSD7A に着目した疾患マウスモデルの確立を目標として研究を開始し、検討の結果、当初予定していた系を糸球体病変に感受性の高いマウス系統で実施する必要があることが判明した。それにより、予定していた実験をすべて進めることはできなかったが、ストラテジーに間違いがないことに確信が持てる結果であったため、引き続

き順次ステップを踏んで研究を進める。本研究助成金は、主に今後の研究の基盤となる条件検討と、マウスの戻し交配に使用した。

上記のように、本研究においては糸球体病変を反映するマウスモデルの確立が容易でないことが明確となっただけに、変更を要しながらも研究が進んだ場合の意義も大きいものと期待できる。引き続き、研究の順序を適宜変更しながら、予備検討を進めつつ、当初の目標を達成できるように努める。

6.文献

- 1) Fervenza FC, Appel GB, Barbour SJ, Rovin BH, Lafayette RA, Aslam N et al. Rituximab or Cyclosporine in the Treatment of Membranous Nephropathy. *N Engl J Med.* 2019; 381, 36-46.
- 2) Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD et al. M-Type Phospholipase A2 Receptor as Target Antigen in Idiopathic Membranous Nephropathy. *N Engl J Med.* 2019; 361(1): 11-21.
- 3) Tomas NM, Beck LH Jr, Meyer-Schwesinger C, Seitz-Polski B, Ma H, Zahner G et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 2014; 371, 2277-2287.
- 4) Sethi S, Madden B, Debiec H, Charlesworth MC, Gross L, Ravindran A et al. Exostosin 1/Exostosin 2-Associated Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2019; 30, 1123-1136.
- 5) Sethi S, Debiec H, Madden B, Charlesworth MC, Morelle J, Gross L et al. Neural epidermal growth factor-like 1 protein (NELL-1) associated membranous nephropathy. *Kidney Int.* 2020; 97, 163-174.
- 6) Sethi S, Debiec H, Madden B, Vivarelli M, Charlesworth MC et al. Semaphorin 3B-associated membranous nephropathy is a distinct type of disease predominantly present in pediatric patients. *Kidney Int.* 2020; 98, 1253-1264.
- 7) Al-Rabadi LF, Caza T, Trivin-Avillach C, Rodan AR, Andeen N, Hayashi N et al. Serine Protease HTRA1 as a Novel Target Antigen in Primary Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2021; doi: 10.1681/ASN.2020101395. Online ahead of print.
- 8) Meyer-Schwesinger C, Tomas NM, Dehde S, Seifert L, Hermans-Borgmeyer I, Wiech T et al. A novel mouse model of phospholipase A2 receptor 1-associated membranous nephropathy mimics podocyte injury in patients. *Kidney Int.* 2020; 97, 913-919.
- 9) Tomas NM, Hoxha E, Reinicke AT, Fester L, Helmchen U, Gerth J et al. Autoantibodies against thrombospondin type 1 domain-containing 7A induce membranous nephropathy. *J Clin Invest.* 2016; 126, 2519-2532.
- 10) Gödel M, Grahammer F, Huber TB. Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A in Idiopathic Membranous Nephropathy. *N Engl J Med.* 2015; 372, 1073-1075.
- 11) Herwig J, Skuza S, Sachs W, Sachs M, Failla AV, Rune G et al. Thrombospondin Type 1 Domain-Containing 7A Localizes to the Slit Diaphragm and Stabilizes Membrane Dynamics of Fully

Differentiated Podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2019; 30, 824-839.

12) Seifert L, Hoxha E, Eichhoff AM, Zahner G, Dehde S, Reinhard L et al. The Most N-Terminal Region of THSD7A Is the Predominant Target for Autoimmunity in THSD7A-Associated Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2018; 29, 1536-1548.

13) Fischer E, Mougenot B, Callard P, Ronco P, Rossert J. Abnormal expression of glomerular basement membrane laminins in membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15(12):1956-64.

14) Tomas NM, Meyer-Schwesinger C, von Spiegel H, Kotb AM, Zahner G, Hoxha E et al. A Heterologous Model of Thrombospondin Type 1 Domain-Containing 7A-Associated Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2017; 28, 3262-3277.

15) Qi Z, Fujita H, Jin J, Davis LS, Wang Y, Fogo AB et al. Characterization of susceptibility of inbred mouse strains to diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2005; 54(9):2628-37.

16) Stewart BJ, Ferdinand JR, Clatworthy MR. Using single-cell technologies to map the human immune system - implications for nephrology. *Nat Rev Nephrol.* 2020; 16, 112-128.

17) Akiyama S, Akiyama M, Imai E, Ozaki T, Matsuo S, Maruyama S. Prevalence of anti-phospholipase A2 receptor antibodies in Japanese patients with membranous nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* 2015; 19, 653-660.

18) Iwakura T, Ohashi N, Kato A, Baba S, Yasuda H. Prevalence of Enhanced Granular Expression of Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A in the Glomeruli of Japanese Patients with Idiopathic Membranous Nephropathy. *PLoS One.* 2015; 10, e0138841.

7.成果発表

当該年度において、本研究そのものの成果発表は行っていない。

本研究に関連した研究として、以下を挙げる。

1) Uchio-Yamada K, Yasuda K, Monobe Y, Akagi K, Suzuki O, Manabe N. Tensin2 is important for podocyte-glomerular basement membrane interaction and integrity of the glomerular filtration barrier. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2020; 318(6):F1520-F1530.

2) Kawakami R, Kitagawa Y, Chen KY, Arai M, Ohara D, Nakamura Y et al. Distinct Foxp3 enhancer elements coordinate development, maintenance, and function of regulatory T cells. *Immunity* 2021; 54(5):947-961.