

## 第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

### Inhibition of the chemokine signal regulator FROUNT by disulfiram ameliorates crescentic glomerulonephritis

ジスルフィラムによるケモカインシグナル調整分子 FROUNT の抑制は半月体形成性腎炎を改善する

日本医科大学大学院医学研究科 解析人体病理学分野  
大学院生 澤田杏理

Kidney International (2022) 掲載

DOI: 10.1016/j.ekir.2022.10.010

腎糸球体基底膜 (GBM) に対する自己抗体が原因で発症する抗 GBM 抗体型糸球体腎炎は、急速進行性腎炎症候群を発症する予後不良な疾患である。従来の治療の効果は限定的で、免疫抑制に伴う感染症などの副作用も問題になることから新規治療薬が求められている。ケモカイン受容体会合分子 FROUNT は、ケモカイン受容体 CCR2 と CCR5 の細胞内領域に結合し、単球・マクロファージの遊走活性を促進する。本研究では FROUNT 抑制による抗 GBM 抗体型糸球体腎炎への治療効果を明らかにするため、FROUNT 阻害活性を有する嫌酒薬 (ジスルフィラム) の抗 GBM 抗体型糸球体腎炎への効果を検討した。

Wistar-Kyoto ラット(100g)に対し、抗ラット GBM 抗体 50 $\mu$ g IgG/100g を投与し腎炎を惹起した。抗体投与前日より臨床用量相当量 (50 mg/kg) およびその 2 倍量 (100 mg/kg) のジスルフィラムを連日経口投与した。対照群には溶媒の 0.5%カルボキシメチルセルロースを投与した。急性炎症が進展する腎炎惹起後 7 日目まで、尿所見、腎病理所見、単離糸球体における遺伝子発現について検討した。慢性病変については腎炎惹起後 30 日目まで検討した。

抗 GBM 抗体投与前日より臨床用量相当量 (50 mg/kg) およびその 2 倍量 (100 mg/kg) のジスルフィラムを投与された群では、対照群と比べて、5 日目、7 日目で糸球体内の半月体形成、尿中アルブミン量の減少を認めた。またマクロファージ浸潤の減少を 3 日目より認め、7 日目までマクロファージ浸潤の増加が抑制された。また 7 日目では糸球体内の CD3, CD8 陽性リンパ球の減少を認めた。ジスルフィラムを腎炎惹起後に投与開始した場合も同様の効果が得られた。

次にジスルフィラムによる腎炎抑制のメカニズムについて検討した。ジスルフィラム投与群では対照群と比べて糸球体糸球体内のマクロファージの長径が縮小していた。また、培養マクロファージにケモカイン受容体 CCR2 のリガンドである CCL2 刺激を加えた際に形成される仮足についてもジスルフィラム添加により抑制され、in vivo の結果と同様にマクロ

ファージ長径の縮小を認めた。この結果から、ジスルフィラムにより糸球体に浸潤したマクロファージの仮足形成が抑制されていることが示唆された。

また、糸球体の遺伝子発現解析において、ジスルフィラム投与群では、TNF- $\alpha$ 、CCL2、CXCL9 の発現が低下した。次に培養マクロファージを用いて、サイトカイン産生に対するジスルフィラムの作用を解析し、ジスルフィラム投与群では TNF- $\alpha$ 、CXCL9、CCL2 の減少を示した。この結果からジスルフィラムが炎症性サイトカイン、ケモカインの産生を直接的に抑制していることが示唆された。

次に、ジスルフィラムの長期的な効果についても検討した。腎炎惹起 30 日後では、ジスルフィラム投与群で糸球体内、尿細管間質双方における  $\alpha$  SMA、Type I Collagen の発現低下を認め、ジスルフィラムによる腎線維化の進展の抑制が示唆された。

最後に、FROUNT の免疫染色をヒト抗 GBM 抗体型糸球体腎炎症例に行い、ヒト抗 GBM 抗体型糸球体腎炎症例の糸球体病変部位に FROUNT 陽性のマクロファージが多数存在していることを確認した。FROUNT 陽性マクロファージがヒト抗 GBM 抗体型糸球体腎炎の進展に関与しており、ジスルフィラムが臨床の抗 GBM 抗体型糸球体腎炎の治療に有効であることが示唆された。

学位論文第二次審査では、FROUNT とケモカイン受容体シグナルとの関係、ジスルフィラムによるケモカイン受容体シグナル抑制機序や炎症性サイトカイン抑制機序の詳細、FROUNT 陽性マクロファージの割合、腎実質細胞の FROUNT 発現、FROUNT ノックアウトマウスの表現型、治療効果が期待できる疾患や病態、今後の臨床応用への展望について質疑応答が行われ、いずれも的確な回答が得られた。

本研究は、ジスルフィラムが FROUNT 抑制作用を介してマクロファージの糸球体への浸潤や活性化を抑制し、ラット抗 GBM 抗体型糸球体腎炎を改善し、長期的な腎保護作用を示した初めての論文である。ジスルフィラムはアルコール依存症に対する治療薬として長らく使用され、安全性は確立されており、早期の臨床応用が期待される。以上から学位論文として十分に価値のあるものと認定した。